



Mouvements actifs, regules par le calcium, de la touffe ciliaire des cellules ciliées mecano-sensorielles de l'oreille interne. .

Jean-Yves Tinevez

► To cite this version:

Jean-Yves Tinevez. Mouvements actifs, regules par le calcium, de la touffe ciliaire des cellules ciliées mecano-sensorielles de l'oreille interne. .. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Denis Diderot, Paris 7, 2006. Français. NNT: . tel-01239897

HAL Id: tel-01239897

<https://hal.science/tel-01239897>

Submitted on 8 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DENIS DIDEROT (PARIS 7)
UFR DE PHYSIQUE

THESE DE DOCTORAT

**MOUVEMENTS ACTIFS, REGULES PAR LE CALCIUM,
DE LA TOUFFE CILIAIRE DES CELLULES CILIEES
MECANO-SENSORIELLES DE L'OREILLE INTERNE.**

Par

Jean-Yves TINEVEZ

Formation doctorale :
Doctorat Interface Physique-Biologie

École doctorale :
Constituants élémentaires – Systèmes complexes

Soutenue le 10 Mars 2006 devant la Commission d'examen

Jury MM

Daniel ROBERT rapporteur

Didier CHATENAY invité

Frank JÜLICHER

François GALLET président du jury

Jim HUDSPETH invité

Jonathon HOWARD

Pascal MARTIN directeur de thèse

Tom DUKE rapporteur

À ma mère et mon père,
Yves et Évelyne Tinevez,
qui ont la capacité rare,
précieuse, inestimable,
d'aimer sans comprendre.

Remerciements

Initialement, je suis venu à faire de la Physique parce que je m'intéressais au son et à l'audition, qui n'ont jamais cessé de me fasciner. Je pensais devoir faire le deuil professionnel de cet intérêt jusqu'à ce que je rencontre Pascal Martin, qui m'a offert l'occasion rare de pouvoir concilier cette fascination avec mon intérêt plus récent pour la Biophysique. Il m'a fait connaître et interagir avec un domaine scientifique passionnant et très demandant.

Si je ne le remerciais que pour m'avoir proposé et permis de mener cette thèse à terme, je serais bien injuste. Tout n'a pas été rose pendant ces quatre années, et ma reconnaissance s'étend en proportion de ce que je lui ai fait subir et des qualités qu'il a dû parvenir à maîtriser en m'encadrant. La première et non la moindre est sans doute la patience, que j'ai eue maintes fois l'occasion de mettre à l'épreuve. Par exemple, alors qu'il m'enseignait l'art de fabriquer les fibres que nous utilisons pour nos expériences, il a pu voir sur une semaine son doctorant briser consciencieusement une à une les excellentes fibres qu'il s'était attelé à fabriquer. J'ai reproduit le même genre d'exploit par la suite en ratant l'une après l'autre les expériences sur les premières grenouilles qu'il s'était épuisé à obtenir. Puis j'ai abîmé le microscope, etc. ... Quand les résultats ont tardé à venir et que je perdais mes derniers fragments d'amour-propre, il a une fois de plus pris sur lui-même, et a été capable de me remettre sur les rails. Tant que nous sommes dans la métaphore ferroviaire, il faut savoir qu'il a véritablement joué le rôle de locomotive vis à vis de ce projet, et a été capable chaque jour de vaincre mon inertie et mes découragements pour nous amener à ce jour, où la thèse est soutenue.

Une autre de ses qualités que j'espère contagieuse est l'amour du travail bien fait et joliment fait. Je me suis rapidement rendu compte qu'il ne suffisait pas qu'un appareillage expérimental fonctionne ; il faut en plus qu'il soit beau. À titre d'exemple : à la page 74 de ce manuscrit, on pourra trouver une photo de notre appareillage, composé d'un microscope autour duquel on peut trouver à gauche et à droite deux micromanipulateurs : celui de gauche permet la stimulation mécanique, celui de droite permet de modifier la concentration de calcium. À cause de la longueur des micropipettes que nous utilisons pour cette modification, j'ai dû éloigner le micromanipulateur de droite de 5 cm par rapport au microscope. Le commentaire de Pascal en voyant cette retouche était « Quel tristesse ! Ce n'est plus symétrique... ». Ce trait se retrouve également dans ses productions écrites : chacune de ses phrases est ciselée et redorée à l'or fin, et chaque mot y trouve sa place avec grâce. Mon avenir en tant que scientifique est aujourd'hui incertain, mais si je deviens un jour un chercheur de métier, je ne peux que souhaiter réussir à atteindre une fraction de ses compétences.

Le domaine au sein duquel j'ai œuvré pendant ces quatre années est effectivement exigeant, mais est composé de scientifiques excellents hommes et travaillant en bonne intelligence, comme j'ai pu m'en rendre compte grâce notamment à mon jury de thèse. Merci à Tom Duke et Daniel Robert, mes rapporteurs, qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je me rends compte que j'ai particulièrement tiré sur la corde en imposant des délais irraisonnables et un stress qui était le mien à l'époque de la fin de la rédaction. En particulier, Daniel Robert a accepté et a mené à bien ce travail, alors que des événements personnels bien plus importants occupaient son emploi du temps. Malgré mes frasques, leur attitude envers moi était toujours encourageante et positive. François Gallet a dû également en profiter, puisqu'il est à la fois le président du ce jury et le président de la commission aux thèses. Il ne s'est jamais départi de son sourire malgré mes multiples retards et coups de stress. Merci et pardon à Didier Chatenay, qui avait également accepté d'être rapporteur, ce à quoi j'ai dû renoncer au dernier moment à cause des règles de composition du jury propre à l'Université. Je suis reconnaissant à Jim Huspeth et Joe Howard pour un grand nombre de bonnes raisons, d'abord pour leur aide technique et scientifique au cours de cette thèse, et également pour leurs encouragements infiniment précieux. Enfin, lors de ce travail j'ai pu collaborer avec Franck Jülicher, et les moments où j'ai pu interagir directement avec lui restent dans ma mémoire parmi les meilleurs du déroulement de cette thèse. Franck est toujours positif, encourageant et optimiste. Je me fais une joie de partir à Dresde sachant qu'il y travaille. On peut comprendre en voyant les huit noms qui composent ce jury que la panique puisse envahir un simple doctorant ; mais je n'ai obtenu de sa part que des encouragements, qu'il en soit remercié dans sa totalité.

Merci à Hervé Gayvallet, mon tuteur de thèse, pour son soutien sans faille et ses encouragements extrêmement précieux. Je dois également remercier ceux de l'UMR 168 qui ont participé à ce travail de thèse. Michel Petit, Gilles Rousseau et Benoît Lemaire de l'atelier mécanique ont réalisé les pièces mécaniques nécessaires à l'appareillage, et les ont refaites sans sourciller lorsque je me suis rendu compte que je ne savais pas tracer un plan. Jean-Hughes Codarbox m'a transmis une partie de son art et m'a appris avec patience à réaliser mes propres circuits électroniques ; je quitte l'Institut Curie en connaissant mieux l'électronique grâce à ses conseils. Jean-François Joanny a réalisé l'assistance théorique indispensable et m'a permis de mener le calcul de la friction visqueuse le long d'une fibre souple (utilisé dans l'annexe C). J'ai d'autres raisons de remercier Martial Balland et Pierre-Yves Plaçais, mais qu'ils le soient dans un premier temps pour leurs assistance technique, nos discussions sans fin, leur attitude vis-à-vis de mon travail et pour m'avoir permis de calibrer mon appareillage grâce au leur.

J'ai également eu la chance de travailler sur un second projet, actuellement mis en œuvre par Sébastien Schaub au sein de l'UMR 144, et dont je ne parle pas

dans ce manuscrit. Au cours de ce travail, j'ai collaboré avec Manuel Théry et Michel Bornens, et cet honneur était doublé d'un plaisir sincère.

Milan Kundera, dans 'L'art du roman', écrit :

« En 1935, trois ans avant sa mort, Edmund Husserl tint, à Vienne et à Prague, de célèbres conférences sur la crise de l'humanité européenne. [...] La crise dont Husserl parlait lui paraissait si profonde qu'il se demandait si l'Europe était encore à même de lui survivre. Les racines de la crise, il croyait les voir au début des Temps Modernes, chez Galilée et chez Descartes, dans le caractère unilatéral des sciences européennes qui avaient réduit le monde à un simple objet d'exploration technique et mathématique, et avaient exclu de leur horizon le monde concret de la vie [...]. L'essor des sciences propulsa l'homme dans les tunnels des disciplines spécialisées. Plus il avançait dans son savoir, plus il perdait des yeux et l'ensemble du monde et soi-même, sombrant ainsi dans ce que Heidegger, disciple de Husserl, appelait, d'une formule belle et presque magique, 'l'oubli de l'être'. »

Bien que ce ne soit pas le sens auquel Milan Kundera pense, je dois remercier ceux qui, à l'instar des œuvres d'art aimées par lui, m'ont éloigné de l'oubli de l'être et, sans faire de science, ont rendu cette thèse possible.

Cédric Housez, Grégory Fourquet, Jérôme Van Praet, Marion Montroussel, Néguine Séghetchian, Sébastien Abellan et Sophie Nanot manifestent un désintérêt profond pour les Sciences dures, et m'ont permis de me rappeler qu'il existe une vie en dehors de la thèse, sans Physique ni Biologie. À chaque fois que je mettais les pieds à Lille ou à Tours, j'avais un toit et j'étais accueilli comme un prince. Je repartais de chez eux lavé de tous les soucis précédents, et à nouveau prêt à en découdre. Merci pour l'élan et votre soutien, qui est aussi précieux qu'un squelette ; ça fait 10 ans que je suis fier d'être votre proche.

Pour venir faire cette thèse, j'ai quitté Lyon et les très bons amis que j'ai là-bas pour une ville titanesque, bien plus grande que l'horizon limité que j'étais capable d'appréhender. Mais au final, c'était pour tomber dans le giron réconfortant d'amis tout aussi précieux. Il est difficile d'être gai en écrivant ces lignes, puisque maintenant que je quitte le laboratoire et Paris, je les quitte aussi comme ceux de Lyon auparavant, ce qui m'amuse aussi peu que la fois précédente.

Merci à la « crème de l'Humanité », Alexandra Mir, Amandine Jaulmes, Bertrand Asseray, Claire Bardel, Jean-Christophe Dubacq, David et Céline Louapre, Jean-Yves Moyen, Juliette Roussel, Hübner Hansen, Pierre Borgnat, Pierre Jammes, Sonia Fargue et Vincent Danjean, pour le « quelque'un de bien », les chansons en faisant la cuisine ou le Dimanche matin après un mariage, les soirées vidéos, les visites aux musées, les thés à rédaction (« encore deux litres de cette excellente infusion à l'ibiscus et je te pond un chapitre en trente minutes »), Mimi, la guitare dans les bars, les glaces Kiwi-Camembert, et le milliard de petites choses que vous faites. Pour rendre Paris belle, être en votre compagnie suffit. Je regrette seulement

de n'avoir profité que trop peu d'elle, comme de celle de tous les gens de ce chapitre ; on corrige ça dans l'avenir ?

J'ai également été le nombre impair d'excellentes personnes, Aliette Leroy, Alexeï Ourjoumtsev, Emmanuelle Le Ray et Matthieu Poujade. Toujours disponibles pour un pot ou un casse-croute, c'était bien d'être dans votre entourage, on ressort la guitare et l'humour de Matthieu quand vous voulez.

Nous avons particulièrement de la chance à l'Institut Curie, puisque en plus de travailler dans un laboratoire dynamique, nous avons le bonheur de côtoyer des personnes exceptionnelles qui deviennent bien plus que des collègues. Ainsi par exemple Luc Fetler et Etienne Huguet, qui ont été mes compagnons de beuverie jusqu'à ce que l'un parte servir le Grand Capital et l'autre fasse une crise de sobriété. Les gens du troisième étage de notre bel Institut ont stoïquement supportés mes bêtises et mes états d'âme pendant 4 ans ; qu'ils soient remerciés pour leur patience et leur soutien. Je garde en souvenir d'excellentes conversations qui ont beaucoup enrichi ma maigre culture extra-scientifique avec des personnes toujours heureuses de partager leurs histoires, notamment Faris El-Alaoui, Hadia Gérardin, Ludwig Berland, Philippe Dewimille, Pia Streicher et Sylvie Coscoy. Nous sommes à une époque où la générosité est tournée en dérision ; merci donc aux personnes à contrecourant, notamment Aurélie Dornier, Cécile Leduc, Ewa Paluch et Julie Plastino pour leur incroyable gentillesse. Merci à Martial Balland, qui insuffle la pêche à tous ceux qu'il côtoie, même quand il est sous pression. Merci à Pierre-Yves Plaçais, la gazette la plus à l'Ouest du 5^{ème} arrondissement. Il y a beaucoup de gens que je ne cite pas explicitement ici. Ce n'est certainement pas un oubli, mais une contrainte d'espace. C'était un honneur et un privilège que d'avoir été votre collègue.

Table des matières

Résumé	3
Table des matières	9
Introduction générale.....	13
I. Introduction.....	15
A. Caractéristiques générales de l'audition.....	15
B. Les cellules ciliées.....	19
B.1. Structure et agencement.....	19
B.2. La touffe ciliaire	20
B.2.1. Les stéréocils	21
B.2.2. Le kinocil.....	22
B.2.3. Les liens latéraux	22
B.2.4. Mouvements global de la touffe ciliaire	23
C. La transduction mécano-électrique	24
C.1. La déflexion de la touffe ciliaire initie la transduction mécano-électrique	24
C.2. Le canal de transduction.....	25
C.3. Le modèle du « gating-spring ».....	27
C.4. Identité des composants moléculaires	28
C.5. Facteur de projection γ	30
D. L'adaptation	31
D.1. L'adaptation restore la mécano-sensibilité d'une touffe ciliaire en présence d'un stimulus saturant	32
D.2. Cinétique de l'adaptation.....	33
D.3. Régulation par le calcium	34
D.4. Corrélats mécaniques de l'adaptation : relaxation et « twitch »	36
D.5. Le modèle du moteur de l'adaptation	38
D.5.1. Le moteur de l'adaptation.....	38
D.5.2. Implication de la myosine 1c dans le phénomène d'adaptation	39
D.5.3. Formulation du modèle « moteur actif »	40
D.6. Le modèle de la refermeture du canal promue par le calcium.....	43
D.6.1. Adaptation lente et adaptation rapide	43
D.6.2. Mécanismes proposés	44
D.6.3. Comparaisons des modèles pour l'adaptation rapide	45
E. Propriétés mécaniques des touffes ciliaires.....	48
E.1. Raideurs de la touffe ciliaire.....	48
E.2. Assouplissement dû à la transduction.....	50
E.2.1. Formulation mathématique.....	51
E.2.2. Mesures des caractéristiques du complexe de transduction.....	52
E.2.3. Raideur négative	53
E.2.4. Remarque : non linéarité mécanique et gamme de sensibilité mécano-électrique .	54
E.3. Friction sur la touffe ciliaire	55
F. Oscillations spontanées	56
G. Un modèle simple de la mécanique d'une touffe ciliaire	58
G.1. Formulation	58
G.2. Trajectoire dans le diagramme F/X	61
II. Méthodes	65
A. Modèle expérimental.....	65

A.1.	Animaux modèles	65
A.2.	Préparation des organes	66
A.2.1.	Le saccule des <i>Rana</i>	66
A.2.2.	Extraction et préparation	68
A.3.	Milieux ioniques et conditions expérimentales	69
A.4.	Mesure des courants transépithéliaux	71
A.4.1.	Protocole	72
A.4.2.	Mesures	73
B.	Dispositif pour la stimulation d'une cellule unique dans l'épithélium sensoriel	74
B.1.	Aperçu général	74
B.2.	Stimulation mécanique d'une touffe ciliaire	76
B.2.1.	Fabrication des fibres	76
B.2.2.	Calibration des fibres	77
B.2.3.	Manipulation des fibres	78
B.2.4.	Stimulation mécanique par déplacement de la base de la fibre	79
B.3.	Détection des mouvements de la fibre et de la touffe ciliaire	81
B.3.1.	Formation des images	81
B.3.2.	Détection par photodiode à deux quadrants	82
B.3.3.	Centrage et calibration du signal	86
B.4.	Fonctionnement en déplacement imposé	86
B.5.	Iontophorèse de composés chargés	88
B.5.1.	Réalisation expérimentale	90
B.5.2.	Estimation de la concentration obtenue	91
B.5.3.	Détermination de la transférabilité du calcium	92
B.6.	Calibration du dispositif	92
B.6.1.	Calibration du grandissement optique	93
B.6.2.	Calibration de l'élément piézoélectrique des photodiodes	93
B.6.3.	Calibration du stimulateur piézoélectrique	94
C.	Procédures de stimulation d'une touffe ciliaire	94
C.1.	Stimulation par une série de marches	94
C.2.	Mesure des courbes force/déplacement	95
C.2.1.	Mesures en boucle ouverte	95
C.2.2.	Mesures en déplacement imposé	96
C.2.3.	Mesures et adaptation	98
C.2.4.	Adhésion de la fibre	99
C.3.	Stimulation par iontophorèse avec biais de la position statique de la touffe ciliaire	100
C.4.	Analyse des oscillations spontanées	102
D.	Simulations numériques	103
III.	Résultats expérimentaux	107
A.	Mouvements actifs d'une touffe ciliaire	107
A.1.	Oscillations spontanées	107
A.2.	« Twitches » en réponse à une stimulation positive	109
A.3.	« Twitches négatifs » en réponse à une stimulation négative	112
B.	Effets de Ca^{2+} sur la cinétique et l'amplitude des mouvements actifs	115
B.1.	Effets sur le twitch positif	115
B.2.	Effets sur la forme des oscillations	117
B.2.1.	Analyse des informations temporelles	118
B.2.2.	Analyse des amplitudes	120
C.	Changements de comportement dynamique	122
C.1.	Changements de comportement dynamique induits par le calcium	122
C.1.1.	Des oscillations spontanées au twitch positif	122
C.1.2.	Des oscillations spontanées au twitch négatif	124
C.1.3.	Du twitch négatif au twitch positif	126

C.2.	Changements de comportement dynamique induits par des déflexions statiques	127
D.	Effet de Ca^{2+} sur la caractéristique F/X d'une touffe ciliaire	129
D.1.	Glissement des courbes F/X	129
D.2.	Déformation des courbes F/X	132
E.	Mouvements ciliaires induits par un échelon de $[\text{Ca}^{2+}]$ en présence d'un biais statique.....	135
E.1.	Polarité et amplitude des mouvements observés	135
E.2.	Inversions de polarité par un biais statique.....	138
IV.	Analyse et interprétation.....	141
A.	Mouvements ciliaires actifs.....	142
A.1.	Oscillations spontanées.....	142
A.2.	Comportements excitables.....	143
A.2.1.	Polarité des mouvements ciliaires adaptatifs.....	146
A.2.2.	Tension dans le ressort de transduction et implications du modèle.....	149
A.2.3.	Interprétation géométrique du twitch positif	151
A.2.4.	Remarque : le twitch est un effet cinétique	154
A.2.5.	Amplitude du twitch	155
A.2.6.	Cinétique de l'adaptation.....	158
A.2.7.	Complétude de l'adaptation.....	160
A.2.8.	Twitch négatif.....	163
A.2.9.	Comportements excitables chez la tortue	164
B.	Effet du calcium sur la mécanique ciliaire	167
B.1.	Effets du calcium sur les propriétés mécaniques statiques	167
B.2.	Glissement des courbes F/X	170
B.3.	Mouvements induits par un échelon de $[\text{Ca}^{2+}]$	172
B.3.1.	Résultats contradictoires chez la grenouille et la tortue	172
B.3.2.	Modification du point de fonctionnement par l'application de biais statiques à la position de la touffe ciliaire.....	174
B.3.3.	Réponse à une modification transitoire de $[\text{Ca}^{2+}]$	175
B.4.	Effets du calcium sur la cinétique des mouvements actifs	179
B.4.1.	Modification des caractéristiques du twitch par le calcium.....	179
B.4.2.	Effets du calcium sur les caractéristiques temporelles des oscillations spontanées	181
C.	Génération de force par les touffes ciliaires des mammifères.....	183
C.1.	Courbes force/déplacement effectives.....	183
C.2.	Mouvement actif de la touffe ciliaire.....	187
V.	Conclusion.....	191
Annexe A.	L'oreille interne des mammifères	195
1.	Description.....	195
2.	Électromotilité des cellules ciliées externes de la cochlée des mammifères.....	197
Annexe B.	Calibration des fibres	199
1.	Fluctuations de l'extrémité d'une fibre libre.....	199
2.	Calibration expérimentale d'une fibre souple	200
Annexe C.	Friction sur une fibre souple.....	203
1.	Estimation théorique	203
2.	Utilisation des instabilités de la rétroaction	205
2.1.	Instabilité dans la rétroaction.....	205
2.2.	Méthode et analyse pour la mesure de la friction d'une fibre.....	206
2.3.	Mesures.....	207

Annexe D.	Hystérésis de l'élément piézoélectrique du stimulateur	209
Annexe E.	Algorithme d'analyse des oscillations	213
Annexe F.	Schémas électroniques.....	215
	1. Voltage clamp pour mesure de courant transépithélial	215
	2. Préamplificateur photodiode	216
	3. Additionneur/soustracteur/diviseur sur carte Europe.....	218
	4. Boucle de rétroaction PID sur carte Europe.....	222
Annexe G.	Valeurs des paramètres utilisés	229
Bibliographie.....		235

Introduction générale

Les sens de l'audition et de l'équilibre des vertébrés reposent sur quelques dizaines de milliers de récepteurs mécano-sensoriels situés au cœur de l'oreille interne – les cellules ciliées. En amplifiant leur réponse au stimulus mécanique auquel elles sont soumises, les cellules ciliées apportent à la détection auditive une sensibilité et une sélectivité fréquentielle proprement stupéfiantes, ceci dans une très large gamme de fréquences et d'intensités sonores. Ce processus d'amplification met probablement en jeu des mouvements actifs des cellules ciliées. Des observations *in vitro* sur des cellules ciliées excisées de l'oreille interne d'animaux divers suggèrent que l'organelle mécano-sensible des cellules ciliées – la touffe ciliaire – n'agit pas simplement comme une sorte « d'antenne mécanique » qui répond à une déflexion en générant un signal électrique. La touffe ciliaire peut également fonctionner comme une petite machine qui transforme de l'énergie d'origine biochimique en un travail mécanique et même osciller spontanément.

Ce travail de thèse vise à étudier expérimentalement les mouvements actifs qu'une touffe ciliaire peut produire, en particulier pour comprendre comment ces mouvements sont régulés par le calcium contenu dans le milieu ionique dans lequel baignent les touffes ciliaires. Nous avons pour cela choisi comme modèle expérimental le saccule de la grenouille taureau que l'on a au préalable excisé de l'oreille interne de l'animal. Afin de mieux se rapprocher des conditions physiologiques naturelles, les cellules ciliées sont plongées dans un environnement ionique à deux compartiments. Les données sont obtenues au travers de la stimulation mécanique d'une touffe ciliaire unique au sein de l'épithélium sensoriel et de la modification locale de la concentration extracellulaire en calcium au voisinage de la touffe ciliaire étudiée.

Pour interpréter les résultats obtenus, nous nous sommes donné un modèle théorique simple de la touffe ciliaire. Des simulations numériques ont été menées conjointement aux expériences, afin de permettre de relier les mesures à des paramètres représentant la réalité moléculaire du fonctionnement de ces cellules.

La partie I de ce manuscrit fait l'état des connaissances actuelles sur les cellules ciliées, la mécano-transduction d'un stimulus mécanique en un signal électrique par ces récepteurs sensoriels et la rétroaction électromécanique qui sous-tend la génération de mouvements ciliaires actifs. Une description théorique minimale de la touffe ciliaire est construite pas à pas en s'appuyant sur des travaux antérieurs.

La partie II est consacrée à la description et à la caractérisation du dispositif expérimental mis en œuvre au laboratoire PCC de l'Institut Curie lors de ce travail de thèse pour stimuler mécaniquement une touffe ciliaire unique du saccule de la

grenouille, mesurer sa caractéristique force-déplacement et modifier localement son environnement ionique.

La partie III présente les comportements dynamiques actifs d'une touffe ciliaire que nous avons observés au cours des expériences, les caractéristiques force-déplacement qui leur correspondent et les effets du Ca^{2+} sur la mécanique ciliaire.

Enfin, la partie IV confronte nos observations expérimentales au modèle simple de la touffe ciliaire qui est présenté dans la partie I et étend l'interprétation des mouvements actifs de la touffe ciliaire qui ont été observés chez la grenouille à d'autres animaux.

I. INTRODUCTION

A. Caractéristiques générales de l'audition

Le détecteur de l'oreille interne, à l'origine des sens de l'ouïe et de l'équilibre, affiche des caractéristiques exceptionnelles. Dans le cas de l'audition et pour la cochlée humaine, le seuil d'audibilité à la fréquence sonore la plus favorable ($10^{-12} \text{ W.m}^{-2}$ à environ 2 kHz) correspond à un apport énergétique par cycle d'oscillation mesuré au niveau du tympan d'environ dix fois l'énergie thermique $k_B T$. Cette grande sensibilité est associée à une gamme dynamique très vaste : du seuil d'audition au seuil de douleur, l'énergie véhiculée par le signal est multipliée par 10^{12} . Cette variation sur douze ordres de grandeurs de la puissance du stimulus ne se retrouve pas dans la sensation subjective d'intensité, qui croît beaucoup plus lentement, approximativement comme le logarithme de la puissance sonore. La transduction du son en influx nerveux est également très rapide : certains mammifères tels que la chauve-souris ou les baleines parviennent à détecter des

sons dont la fréquence va jusqu'à la centaine de kilohertz. Enfin, notre audition fait preuve d'une excellente discrimination fréquentielle : nous pouvons distinguer deux sons purs émis successivement si leurs fréquences présentent un écart relatif $\Delta f/f > 0,1\%$ autour de 2 kHz.

Les expériences de psychoacoustique réalisées par Gold et Pumphrey en 1948, [Gold & Pumphrey, 1948] montrent que l'oreille interne est capable d'accumuler de l'énergie sur plusieurs cycles de l'onde de pression sonore : un son pur est plus facile à détecter s'il dure plus longtemps. Ces résultats suggèrent que l'oreille fonctionne comme un résonateur dont le facteur de qualité serait l'ordre de 100 à 1 kHz. Néanmoins, Gold remarqua que les structures de l'oreille interne qui sont mises en mouvements par l'onde sonore devraient être sur-amorties, car elles sont immergées dans un liquide visqueux. Il en conclut [Gold, 1948] que la cochlée ne peut fonctionner seulement comme un résonateur passif : un mécanisme actif doit permettre de contrer la dissipation visqueuse pour amplifier le signal avant qu'il ne soit transmis par les neurones.

Des mesures réalisées *in vivo* des vibrations mécaniques locales au niveau de la membrane basilaire (décrite dans l'annexe A) reflètent les excellentes caractéristiques de l'audition, telles qu'elles ont pu être évaluées par les expériences de psychoacoustique citées plus haut. Le raffinement des techniques expérimentales a permis l'étude de cochlées « vivantes » [Ruggero *et al*, 1986 ; 1986 ; Sellick *et al*, 1982], par opposition aux mesures faites sur des cochlées extraites de cadavres [von Békésy, 1960]. La réponse de la membrane basilaire à un son pur apparaît très localisée, alors que la sélectivité spatiale est très faible sur des cochlées mortes [von Békésy, 1960]. De même, le seuil de stimulation nécessaire pour obtenir un mouvement détectable de la membrane basilaire est 100 à 1000 fois plus faible avec des cochlées vivantes (Figure I-1.A).

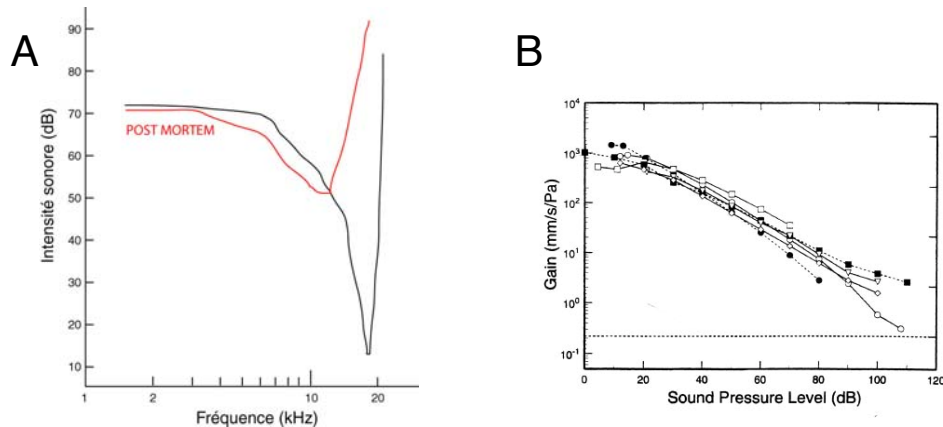


Figure I-1 : **A.** Intensité sonore nécessaire pour obtenir un mouvement mesurable de la membrane basilaire à une position donnée le long de la cochlée (proche de sa base) en fonction de la fréquence. Figure adaptée de [Sellick et al, 1982]. L'intensité sonore $I_{dB}=20 \log(P/P_{ref})$ est une fonction logarithmique de la pression sonore, où P représente l'écart de pression à la pression atmosphérique et $P_{ref}=20 \mu Pa$ est un écart de référence, proche du seuil de sensibilité psychoacoustique de l'oreille humaine. **B.** Sensibilité (définie comme étant le rapport de l'amplitude de la vitesse de la membrane basilaire par celle du stimulus sonore) en fonction de l'intensité sonore. Figure tirée de [Ruggero et al, 1997]. On observe une non-linéarité de compression de la sensibilité sur quatre ordres de grandeur de pression sonore.

La réponse mécanique d'une cochlée physiologiquement intacte est non-linéaire [Rhode, 1971 ; 1980]. Alors que la gamme des sons audibles s'étend sur douze ordres de grandeur d'énergie acoustique, les vibrations mécaniques mesurées au niveau de la membrane basilaire ont une amplitude qui varie de la fraction de nanomètre jusqu'à la centaine de nanomètres. La sensibilité de la cochlée, définie comme le rapport de l'amplitude de vibration de la membrane basilaire par l'intensité du son qui la provoque est plus importante à bas qu'à fort volume sonore (Figure I-1.B, [Ruggero, 1992]). Le rapport entre la sensibilité mesurée aux très faibles intensités et celle mesurée aux très grandes intensités (à la fréquence caractéristique du point de la cochlée où l'on fait la mesure) peut aller jusqu'à 78 dB, ce qui correspond à un gain d'environ 1000 [Robles & Ruggero, 2001].

Plusieurs décades après les travaux de Gold, il a été proposé qu'un amplificateur cochléaire [Dallos, 1992 ; Davis, 1983], très labile, améliorerait la sensibilité et la sélectivité fréquentielle de la cochlée aux faibles sons. L'observations d'émissions otoacoustiques [Kemp, 1978 ; Wilson, J. P., 1980] est venue conforter cette hypothèse. L'oreille émet des sons en réponse à un stimulus sonore bref (un « click »). Il est possible de définir un coefficient de réflexion pour ces émissions comme étant le rapport de l'intensité sonore du son émis sur celle du stimulus. Ce coefficient de réflexion augmente lorsque l'intensité du stimulus

diminue. De plus, plongée dans un environnement silencieux, l'oreille peut même émettre spontanément des sons (Figure I-2). Ces émissions otoacoustiques spontanées, que Gold avait prédites [Gold, 1948] mais n'avait pu mettre en évidence, sont observées chez tous les vertébrés étudiés jusqu'à présent [Manley & Köppl, 1998]. Elles apportent la preuve que l'oreille est capable de puiser dans ses réserves énergétiques pour entretenir des oscillations mécaniques.

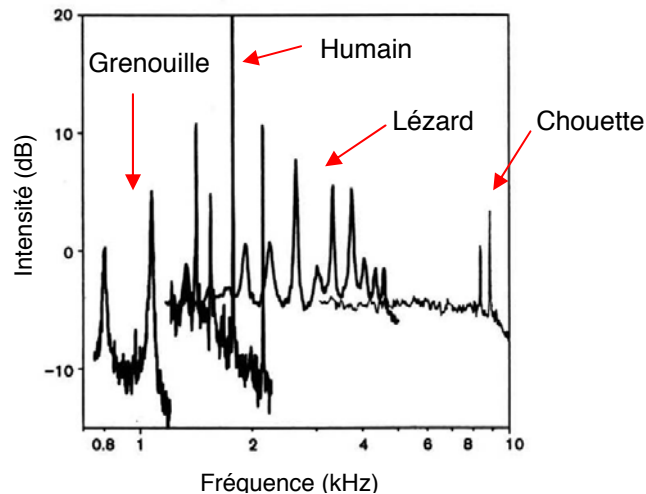


Figure I-2 : Exemples de spectres d'émissions otoacoustiques spontanées.
Adapté de [Manley & Köppl, 1998].

À ce mécanisme actif est attribué l'origine des quatre caractéristiques sus-citées : les très bonnes sensibilité et discrimination fréquentielle résultent de l'amplification sélective en fréquence qu'il offre, la large gamme dynamique est produite par une non-linéarité compressive de l'amplificateur, et les émissions otoacoustiques proviennent de son fonctionnement en régime instable. Les propriétés mécaniques de la cochlée ont été récemment reconnues comme des signatures de systèmes dynamiques opérant à proximité d'une instabilité oscillatoire, une bifurcation de Hopf. En particulier, la non-linéarité de la réponse mécanique de la membrane basilaire à un son d'intensité croissante peut être décrite par une loi de puissance caractéristique d'un tel système dynamique [Camalet *et al*, 2000 ; Duke & Julicher, 2003 ; Eguiluz *et al*, 2000]. Il est maintenant généralement accepté que l'amplificateur cochléaire trouve son origine dans les quelques milliers de cellules mécano-sensorielles de l'oreille interne, les cellules ciliées [Fettiplace *et al*, 2001 ; Hudspeth & Corey, 1977 ; Robles & Ruggero, 2001]. Nous nous limiterons dans la suite à l'étude des processus au niveau de la cellule ciliée unique, capables de convertir de l'énergie biochimique en énergie mécanique pour générer activement des forces qui pourraient améliorer les performances de la cellule ciliée pour détecter de minuscules stimuli mécaniques oscillants.

B. Les cellules ciliées

B.1. Structure et agencement

Les cellules ciliées sont dans l'oreille interne le siège de la transduction des stimuli mécaniques en signaux nerveux. Selon l'organe considéré, elles peuvent être de taille et d'aspect variés et s'arranger selon différentes manières, mais leur architecture et leur fonctionnement général restent similaires. Ce sont des cellules épithéliales cylindriques, dont le corps a un rayon variant de 5 à 10 μm et une longueur allant de 10 μm à 50 μm . Bien que capable d'initier des signaux nerveux, elles ne possèdent ni dendrites ni axones. Elles sont par contre munies d'une organelle très spécialisée, la touffe ciliaire, qui joue le rôle d'une antenne mécanoréceptrice (voir section B.2).

Dans l'épithélium où elles interviennent, elles sont enchâssées au sein de plusieurs cellules supportrices (non sensorielles) auxquelles elles sont jointes par des jonctions serrées à proximité de leur extrémité apicale. Ces jonctions serrées permettent d'assurer une compartimentation des milieux extracellulaires : la surface apicale des cellules ciliées et supportrices forme une paroi étanche. Ainsi, le corps des cellules ciliées est immergé dans un milieu extracellulaire standard (la périlymphe), alors que leur partie apicale, qui inclue la touffe ciliaire, plonge dans un milieu totalement différent, l'endolymphe. Le sodium est le cation principal de la périlymphe ; ce milieu ionique possède peu de potassium et a une concentration en calcium relativement élevée (de l'ordre du mM). L'endolymphe est plus proche d'un milieu intracellulaire : il contient majoritairement le cation potassium (les formulations sont données au paragraphe II.A.3). Des terminaisons nerveuses afférentes et efférentes se connectent à la partie basolatérale de la membrane plasmique des cellules ciliées et assurent le relais du signal nerveux.

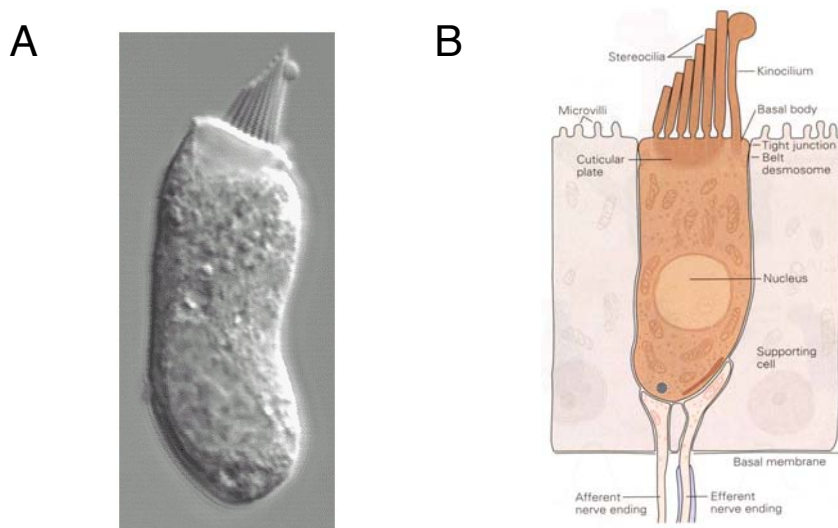


Figure I-3: **A.** Cellule isolée du saccule de la grenouille taureau vue en contraste de Nomarski (Hudspeth). **B.** Schéma d'une telle cellule au sein de son épithélium [Hudspeth, 2000].

B.2. La touffe ciliaire

La touffe ciliaire émerge de l'extrémité apicale de la cellule, enracinée dans un cortex dense d'actine qui forme une structure rigide, la plaque cuticulaire. Cette organelle est un arrangement quasi hexagonal (Figure I-5.A) de plusieurs dizaines de bâtonnets cylindriques rigides, dont la hauteur varie selon les cellules d'environ $1\ \mu\text{m}$ à la dizaine de micromètres, appelés stéréocils. Au sein d'une touffe ciliaire, les stéréocils s'organisent en rangées de taille croissante, à la manière de tuyaux d'orgues, ce qui donne une orientation à la touffe ciliaire. Le long de cette direction et parallèlement aux stéréocils, la touffe ciliaire présente un plan de symétrie bilatérale (Figure I-4).

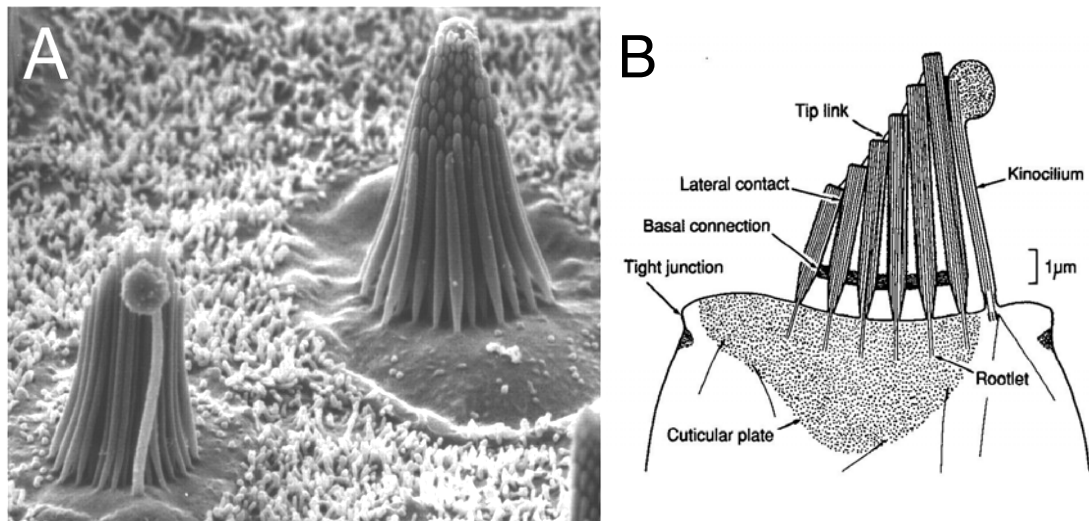


Figure I-4 : **A.** Touffes ciliaires du saccule de la grenouille taureau vues en microscopie électronique. Grossissement $\times 15000$ [Holt & Corey, 2000]. On distingue nettement le kinocil sur la cellule de gauche et l'arrangement en rangées de taille croissante sur celle de droite. **B.** Schéma en coupe d'une touffe ciliaire de la grenouille taureau dans le plan de symétrie bilatérale [Howard et al, 1988].

B.2.1. Les stéréocils

Chaque stéréocil est constitué d'un faisceau parallèle d'environ 300 filaments d'actine (Figure I-5.B) dans un arrangement quasi cristallin, ce qui lui donne une rigidité très importante. Ces filaments sont orientés de telle manière à avoir l'extrémité barbée dirigée vers le sommet du stéréocil. Le diamètre d'un stéréocil est de quelques centaines de nanomètres [Tilney & Saunders, 1983], et s'affine aux trois quarts en son point d'insertion dans la plaque cuticulaire [Tilney et al, 1980]. Le nombre de filaments d'actine qui ancrent le stéréocil à la surface apicale de la cellule est bien moindre (une trentaine), ce qui rend le stéréocil plus souple en ce point. En conséquence, une force appliquée au sommet d'un stéréocil entraînera son pivotement autour de son point d'insertion dans la plaque cuticulaire plutôt que son flambage.

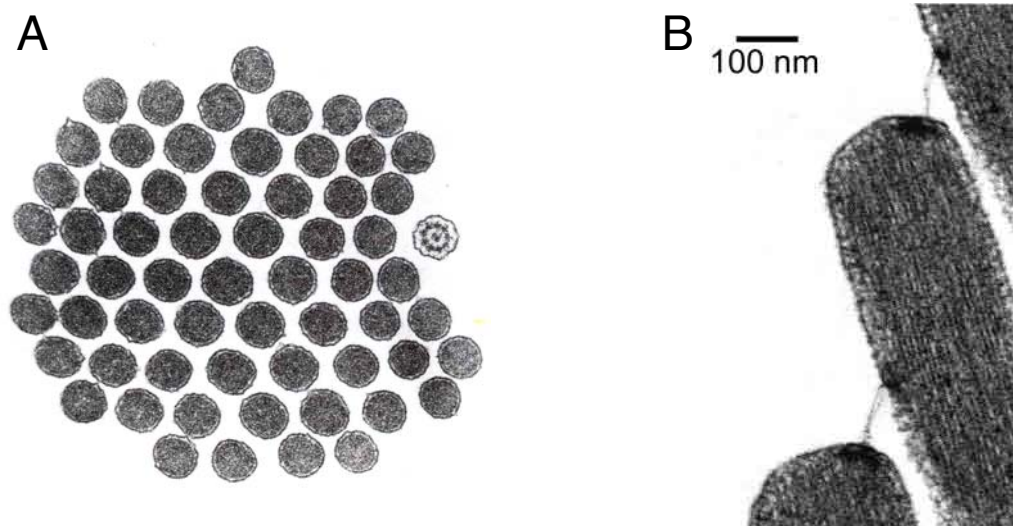


Figure I-5: Vue en microscopie électronique des stéréocils [Jacobs & Hudspeth, 1990]. **A.** Section transverse de la touffe ciliaire ($\times 23000$). Les stéréocils sont arrangés de manière quasi hexagonale. Sa structure particulière permet de distinguer le kinocil, à droite sur cette image. On remarque également l'existence de liens latéraux reliant les stéréocils. **B.** Coupe longitudinale. Noter l'arrangement dense des filaments d'actine et les liens de bout de cils entre chaque stéréocil, aux bouts desquels on distingue des zones électriquement denses, les plaques insertionnelles.

B.2.2. Le kinocil

La rangée des stéréocils les plus longs est parfois accolée à un vrai cil, le kinocil, constitué de neuf paires de microtubules (auxquels s'ajoute une paire au centre), et surmonté par un bulbe d'environ $1\ \mu\text{m}$ de diamètre (Figure I-4.A). Dans la cochlée, celui-ci dégénère, se rétracte et finit par disparaître une fois le développement de la cellule ciliée terminée. Il persiste dans les cellules ciliées des organes vestibulaires, mais ne semble pas requis pour la transduction [Jacobs & Hudspeth, 1990]. Dans ce dernier cas, il est couplé au reste de la touffe ciliaire par des liens latéraux à proximité de son sommet.

B.2.3. Les liens latéraux

Chaque stéréocil est couplé à ces voisins par de nombreux liens latéraux dont quatre types ont été identifiés [Goodyear & Richardson, 1992 ; 1999 ; 2003]. Parmi eux, trois sont des liens horizontaux qui se répartissent le long du stéréocil, et dont le rôle est méconnu. Leur suppression par une protéase diminue la raideur globale de la touffe ciliaire pour la cochlée aviaire [Bashtanov *et al*, 2004], mais n'abolit

pas la mécano-transduction. Les liens de bout de cils¹, se distinguent des précédents par leur agencement et leur rôle, que l'on abordera plus loin (section C.3). Le sommet de chaque stéréocil est relié par un lien de bout de cil unique au flanc du stéréocil de la rangée suivante la plus grande, où il semble être ancré dans une plaque électroniquement dense de 50 nm par 70 pour une épaisseur de 20 nm (Figure I-5.B), appelée plaque insertionnelle. Ces liens de bout de cils ne sont pas présents entre stéréocils d'une même rangée, et sont alignés sur le plan de symétrie de la touffe ciliaire. Le point d'ancrage sur le grand stéréocil est nettement au dessus du sommet du petit, et ce faisant, l'orientation des liens de bout de cil est proche de celle de l'axe des stéréocils.

B.2.4. Mouvements global de la touffe ciliaire

Lorsqu'une déflexion est imposée à la touffe ciliaire, on observe que celle-ci se déplace en bloc, et que chaque stéréocil reste accolé à ses voisins (Figure I-6.A). Ainsi, si un stéréocil est tangent en son sommet au flanc du stéréocil de la rangée adjacente, la déflexion de la touffe ciliaire le fait glisser le long de ce stéréocil, avec lequel il reste en contact. Cet arrangement compact, qui persiste même lorsque la touffe ciliaire est stimulée, pourrait être la conséquence de l'existence des liens latéraux mentionnés ci-dessus. Dans le saccule de la grenouille, la plaque cuticulaire dans laquelle sont insérés les stéréocils présente une convexité, qui pourrait également participer au maintien de cette structure [Hudspeth, 1983]. Si l'on suppose que l'insertion de chaque stéréocil est perpendiculaire à la plaque cuticulaire, la forme convexe de cette plaque force les stéréocils à rester en contact (Figure I-6.B).

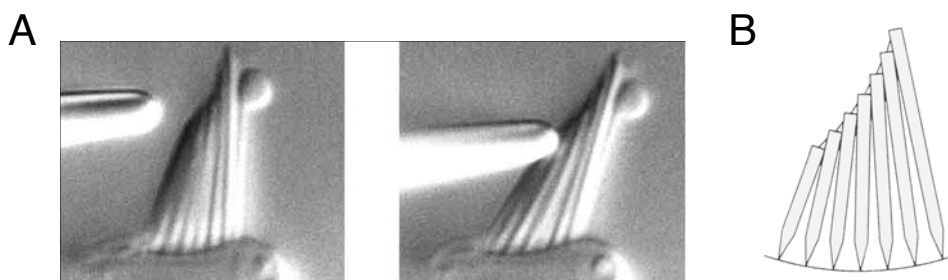


Figure I-6 : **A.** Une déflexion appliquée à la touffe ciliaire la défléchit en masse. **B.** La courbure de la plaque cuticulaire est telle qu'elle rassemble les stéréocils en leur sommet. Tiré de [Jacobs & Hudspeth, 1990].

¹
« tip-links »

C. La transduction mécano-électrique

C.1. La déflexion de la touffe ciliaire initie la transduction mécano-électrique

La sensibilité d'une cellule ciliée à un stimulus mécanique fait montre d'une directionnalité très marquée. Les stimuli dirigés selon la direction des tailles de stéréocils croissantes dépolarisent la cellule. Les stimuli dans le sens opposé l'hyperpolarisent et ceux dans la direction orthogonale n'ont pas d'effet sur le potentiel de la cellule [Flock, 1965 ; Harris *et al*, 1970 ; Jones & Milsom, 1970 ; Wersäll *et al*, 1965]. De manière plus générale, seule la composante du stimulus selon l'axe horizontal dans le plan de symétrie bilatérale de la touffe ciliaire détermine la réponse de la cellule [Shotwell *et al*, 1981].

Des stimuli saturants parviennent à faire varier le potentiel de la cellule d'environ une dizaine de millivolts autour de son potentiel de repos (d'environ -60mV), et cette variation est associée à une augmentation de la conductance totale de la membrane [Hudspeth & Corey, 1977]. Une déflexion dans le sens des rangées de taille croissante, que l'on dénommera *positive* par convention, vient donc ouvrir des canaux dans la membrane de la cellule, ce qui cause un afflux de cations dans le corps cellulaire qui dépolarise la cellule. Comme l'endolymphé contient principalement le cation potassium, c'est lui qui *in vivo* transporte la majeure partie du courant de transduction. Cette entrée de cations vient ensuite ouvrir des canaux calcium sensible au potentiel dans la paroi basale de la cellule, ce qui vient encore accentuer la dépolarisation. Puis, l'accumulation de calcium dans le cytoplasme active des canaux potassium sensibles au calcium qui, avec d'autres canaux potassium sensibles au potentiel, permettent l'efflux de potassium dans la périlymphe, assurant ainsi la repolarisation de la cellule. Le calcium est lui extrudé du corps cellulaire par des pompes ATPases (Figure I-7.B). L'augmentation du calcium intracellulaire induite par la dépolarisation déclenche au niveau des synapses afférentes la libération de neurotransmetteurs (glutamate) à l'origine d'un signal nerveux.

La réponse électrique de la cellule ciliée peut être caractérisée par deux grandeurs ; soit on vient mesurer les variations du potentiel intracellulaire causées par les déflexions de la touffe ciliaire à l'aide d'une microélectrode, soit on fixe ce potentiel et on mesure le courant de transduction dans une expérience de patch clamp. La dépendance en l'amplitude de stimulation de cette réponse est sigmoïdale ; quelques centaines de nanomètres suffisent à obtenir une réponse saturante (Figure I-7.A). En accord avec l'extrême sensibilité de ces détecteurs,

celle-ci correspond à une rotation des stéréocils autour de leur pivot qui n'est que de quelques degrés.

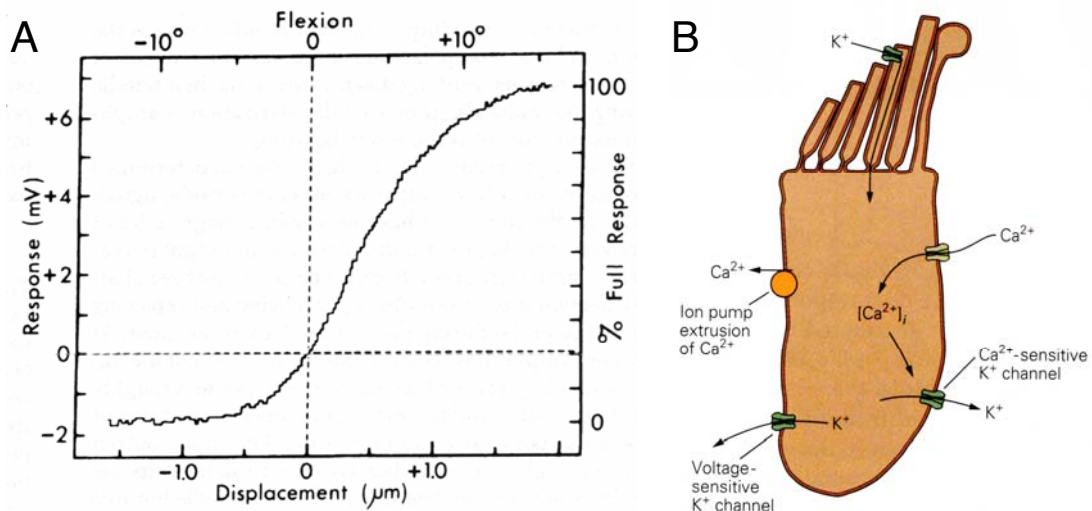


Figure I-7 : **A.** Réponse électrique d'une cellule ciliée du saccule de la grenouille taureau [Hudspeth & Corey, 1977]. **B.** Schéma de la cascade de transduction [Hudspeth, 2000].

C.2. Le canal de transduction

Le canal responsable de la transduction du signal est un canal cationique faiblement sélectif [Corey & Hudspeth, 1979 ; Jorgensen & Kroese, 1994 ; Ohmori, 1985] dont la taille du pore a été estimée à 0,7nm [Corey & Hudspeth, 1979]. Il présente néanmoins une plus forte affinité pour les ions divalents comme le calcium que pour les ions monovalents [Jorgensen & Kroese, 1994 ; Ohmori, 1985] : l'augmentation du calcium extracellulaire entraîne une diminution du courant de transduction, celui-ci étant porté majoritairement par le potassium [Corey & Hudspeth, 1983a ; Crawford *et al*, 1991 ; Lumpkin *et al*, 1997]. Le canal est également bloqué de manière réversible par les amilorides avec une concentration bloquante médiane de 50μM [Jorgensen & Ohmori, 1988]. Il en est de même pour les aminoglycosides (tels que la gentamicine), avec une concentration bloquante médiane allant de 2μM à 95μM, et qui agissent de manière dépendante du potentiel [Kroese *et al*, 1989].

Les estimations de la conductance d'un canal unique varient beaucoup dans la littérature ; elles sont résumées dans le tableau ci-dessous. On retiendra que cette conductance est de l'ordre de la centaine de piciemens. Comme elle est grande, un faible nombre de ces canaux serait suffisant pour produire un courant de transduction important.

Modèle	Référence	Méthode	Valeur
Rana catesbeiana (sacculée)	[Holton & Hudspeth, 1986]	Analyse de bruit sur les courants récepteurs	17 pS ²
<i>id</i>	[Denk <i>et al</i> , 1995]	Courant macroscopique et nombre de canaux	87 pS
Poulet (cochlée)	[Ohmori, 1984 ; 1985]	Mesure de pas discrets dans la forme du courant récepteur	50 pS ³
Tortue (cochlée)	[Crawford <i>et al</i> , 1991]	Mesure sur canal unique	100 pS
Souris (cellules externes de la cochlée)	[Géléoc <i>et al</i> , 1997]	<i>id</i>	112 pS

Tableau I-1 : Conductance du canal de transduction pour différents organes et animaux

Trois séries différentes de données indiquent que ces canaux seraient localisés au sommet des stéréocils. Tout d'abord, un courant de transduction génère une chute de potentiel extracellulaire locale à proximité du faîte de la touffe ciliaire [Hudspeth, 1982]. D'autre part, la gentamicine bloque le courant de transduction de manière optimale si, lors d'une application par iontophorèse, elle est éjectée à proximité des sommets des stéréocils [Jaramillo & Hudspeth, 1991]. Enfin, une sonde fluorescente intracellulaire sensible au calcium indique que, en réponse à une déflexion, cet ion pénètre dans la cellule $\sim 1 \mu\text{m}$ en dessous de l'extrémité des stéréocils [Lumpkin & Hudspeth, 1995 ; 1998].

Enfin, le nombre de canaux est très limité. Les pas discrets vus dans la forme du courant de transduction chez le poulet donnent une estimation d'environ 20 canaux par cellules [Ohmori, 1984 ; 1985]. Les analyses du bruit dans ce courant [Holton & Hudspeth, 1986] ainsi que les mesures des forces impliquées dans la transduction [Howard & Hudspeth, 1988] placent cette estimation entre 50 et 100 dans le sacculée de la grenouille taureau. Comme il y a un nombre comparable de stéréocils et qu'il a été observé que la réponse électrique était proportionnelle au nombre de stéréocils restant après microdissection [Hudspeth & Jacobs, 1979], il est probable qu'on ne trouve qu'un seul ou deux de ces canaux sur chaque stéréocil.

²

L'un des auteurs remarque que cette valeur est peut être sous-estimée car la mesure des fluctuations du courant de transduction a été faite avec une bande passante (1kHz dans l'article) qui pourrait être inférieure à la fréquence d'ouverture et fermeture stochastiques des canaux, comme le suggère une étude plus récente [van Netten *et al*, 2003].

³

L'auteur souligne que cette mesure a put être corrompue par un artefact dû à la méthode de stimulation.

C.3. Le modèle du « gating-spring »

La transduction des stimuli mécaniques est très rapide : la cellule ciliée répond aux stimuli avec un délai d'environ 25 μs à température ambiante [Corey & Hudspeth, 1979] – à titre de comparaison, les photorécepteurs de l'œil ne répondent qu'avec un temps d'une centaine de millisecondes. Il a également été remarqué que cette cinétique dépend de la température et de l'amplitude du stimulus [Corey & Hudspeth, 1983b] : les variations de τ_c , la constante de temps caractéristique de cette transduction, sont bien décrites par la loi d'Arrhenius :

$$\tau_c(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta G_b}{k_B T}\right)$$

où T est la température, et chez la grenouille, $\tau_0^{-1} \approx 6.10^{12} \text{ Hz}$, et $\Delta G_b \approx 80 \text{ zJ}$. La barrière énergétique ΔG_b dépend de l'amplitude du stimulus, mais pas ou peu de la température.

La rapidité de la transduction suggère un mécanisme où les canaux sont directement activés par le stimulus mécanique [Corey & Hudspeth, 1983a ; Howard, 2001], sans faire appel à des réactions enzymatiques intermédiaires ou la libération et la diffusion de seconds messagers biochimiques. Dans le cadre du modèle du « gating-spring », la probabilité d'ouverture du canal de transduction est directement contrôlée par une augmentation de tension dans un élément élastique, appelé ressort de transduction⁴, qui lui est lié. Lorsque la tension est nulle ou trop faible, tous les canaux sont dans l'état fermé. Une augmentation de tension due à une stimulation positive vient favoriser l'état ouvert de ces canaux (Figure I-8).

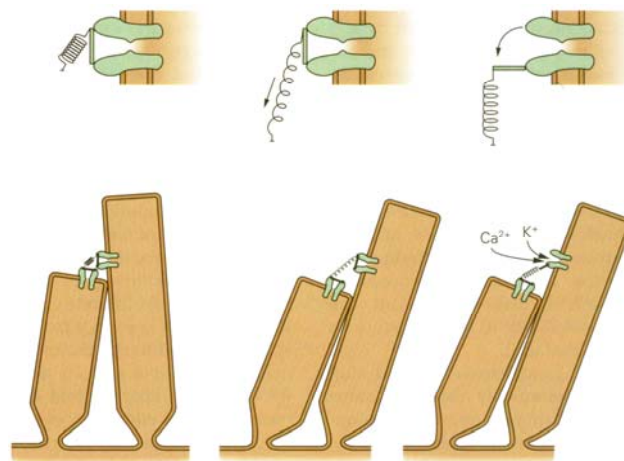


Figure I-8 : Schéma du modèle du gating-spring, adapté de [Assad et al, 1991]. Les auteurs identifient ici le lien de bout de cil au ressort de transduction et placent un canal à chacune de ses extrémités.

⁴ « gating-spring »

On se place dans le cadre le plus simple de ce modèle où le canal ne possède que deux états, l'un ouvert, l'autre fermé [Corey & Hudspeth, 1983b ; Howard & Hudspeth, 1988 ; Howard *et al*, 1988]. On suppose que l'on défléchit la touffe ciliaire horizontalement d'une quantité X , mesurée au niveau du bulbe du kinocil. La différence d'énergie libre $\Delta G = G^{ouvert} - G^{fermé}$ entre les deux états du canal est la somme de deux contributions :

$$\Delta G = \Delta\mu + \Delta G_{el}(X)$$

La première est la différence d'énergie libre pour un canal non lié au ressort de transduction. Sa valeur a été évaluée chez la grenouille taureau comme étant de l'ordre de 4.10^{-20} J (soit $10 \times k_B T$) [Hudspeth, 1992]. La seconde contribution représente la contribution de l'énergie élastique stockée dans ce lien. Celui-ci a une raideur k_{GS} et une extension au repos x_r correspondant à la situation où le canal serait à mi-chemin entre l'état ouvert et l'état fermé. Une déflexion de la touffe ciliaire dans la direction excitatrice ($X > 0$) entraîne une élongation supplémentaire de ce ressort que l'on notera $x = \gamma X$, où γ est un facteur de projection. L'ouverture du canal est associée à un changement de conformation qui raccourcit la longueur du ressort d'une quantité dénotée d . Alors :

$$\begin{cases} G_{el}^{fermé} = \frac{1}{2} k_{GS} \left(x_r + x + \frac{d}{2} \right)^2 \\ G_{el}^{ouvert} = \frac{1}{2} k_{GS} \left(x_r + x - \frac{d}{2} \right)^2 \end{cases}$$

Il s'ensuit que la différence d'énergie libre entre les deux états est une fonction linéaire de X : $\Delta G(X) = -ZX + \Delta G(0)$ où $Z = \gamma k_{GS} d$, appelé force de transduction, caractérise la sensibilité du canal aux déplacements.

En supposant que les canaux s'équilibrent suffisamment vite pour pouvoir être à l'équilibre pour tout X , la probabilité d'ouverture de ceux-ci est donnée par la loi de Boltzmann :

$$P_o = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G}{k_B T}\right)} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{Z(X - X_0)}{k_B T}\right)} \quad (I.1)$$

où $X_0 = \frac{\Delta\mu}{Z} - \frac{x_r}{\gamma}$ est la déflexion de la touffe ciliaire pour laquelle la moitié des canaux sont ouverts, k_B la constante de Boltzmann, et T la température.

C.4. Identité des composants moléculaires

De nombreux résultats expérimentaux permettent d'associer aux éléments de ce modèle des constituants moléculaires. Les liens de bout de cils [Pickles *et al*,

1984] sont idéalement placés et orientés pour faire partie de la machinerie de transduction et contribuer au ressort de transduction. On les trouve au sommet de la touffe ciliaire, à proximité des canaux de transduction. Leur orientation quasi parallèle aux stéréocils et le fait qu'ils se trouvent dans le plan de symétrie bilatérale de la touffe ciliaire assurent qu'ils sont mis sous tension lors d'une déflexion positive, mais pas pour une déflexion orthogonale à cette direction. Enfin, une exposition des touffes ciliaires à certain chélateurs du calcium basé sur des tétracarboxylates (par exemple BAPTA) abolit la transduction [Crawford *et al*, 1991 ; Hudspeth & Corey, 1977] concomitamment à une disparition des liens de bout de cil [Assad *et al*, 1991 ; Furness & Hackney, 1985 ; Zhao *et al*, 1996]. Lorsque, sur des cellules en culture, ces liens se régénèrent, la transduction reparaît [Zhao *et al*, 1996]. Ces observations indiquent que le lien de bout de cil fait partie du complexe de transduction : mis sous tension par un stimulus positif, il permettrait l'ouverture des canaux.

Les études fondées sur la microscopie électronique [Kachar *et al*, 2000 ; Tsuprun *et al*, 2004] ont révélées que les liens de bout de cils étaient composés de deux proto-filaments enroulés en une hélice dextrogyre de périodicité d'environ 20 nm, et de diamètre compris entre 8 et 10 nm. La cadhérine 23 semble impliquée dans sa structure [Siemens *et al*, 2004 ; Sollner *et al*, 2004] ce qui suggère que le lien de bout de cil est formé de l'association homophile de deux domaines extracellulaires de la cadhérine 23, chacun provenant d'un des deux stéréocils entre lesquels il est tendu. Des simulations de dynamiques moléculaires qui tiennent compte de ces données structurales [Sotomayor *et al*, 2005] indiquent qu'il serait trop rigide pour pouvoir être identifié avec le ressort de transduction (comme représenté sur la figure I-8). Le lien de bout de cil réside très probablement en série avec ce dernier et lui transmet la tension sans se déformer significativement.

L'identité moléculaire du canal ionique de transduction est longtemps demeurée mystérieuse, jusqu'à ce qu'un canal de la famille TRP (Transient-Receptor-Potential) soit découvert chez la drosophile [Strassmaier & Gillespie, 2002 ; Walker *et al*, 2000], le canal TRPN1⁵. Ce canal est impliqué dans la mécano-transduction avec une sensibilité et une cinétique très similaires à celles trouvées dans les cellules ciliées des vertébrés. A partir de cette observation, des gènes candidats de la famille TRP furent testés chez la souris [Corey *et al*, 2004] et l'un d'eux – TRPA1 – exhibe les caractéristiques requises pour être un composant du complexe de transduction. Cette protéine présente à son extrémité N-terminale intracellulaire une répétition de 17 domaines ankyrine. Le canal TRPN1 possède la même caractéristique, avec toutefois une répétition de 29 domaines. Ces domaines devraient former exactement un tour d'une hélice, une structure qui pourrait avoir la

⁵ autrefois dénommé NOMP-C

bonne raideur pour constituer le ressort de transduction [Corey & Sotomayor, 2004 ; Howard & Bechstedt, 2004]. Par analogie, il est suggéré que la répétition du canal TRPA1 chez les vertébrés présente les mêmes attraits [Corey *et al*, 2004 ; Sotomayor *et al*, 2005]. Cette hypothèse fait du ressort de transduction un composant intracellulaire.

C.5. Facteur de projection γ

Si le ressort de transduction s'identifie avec le lien de bout de cil ou avec un élément plus souple en série avec ce lien, on peut estimer simplement le facteur de projection γ , introduit dans le paragraphe précédent, qui relie la déflexion X d'une touffe ciliaire à l'extension x du ressort de transduction. Chaque stéréocil pivote autour de son propre point d'insertion dans la plaque cuticulaire. Une déflexion de la touffe ciliaire se traduit donc pour un stéréocil par un cisaillement vis à vis de ses voisins dans la direction du stimulus ; ceux dans la direction orthogonale restent immobiles par rapport à lui. Une déflexion de la touffe ciliaire entraînera un glissement d'un stéréocil le long de la paroi de son voisin d'une longueur x . À cause de l'orientation des liens de bout de cils, cette longueur x correspond à l'élongation du ressort de transduction (Figure I-9). Le facteur γ apparaît comme étant un gain géométrique, qui relie le cisaillement entre stéréocils à la déflexion horizontale X mesurée au niveau du bulbe du kinocil, dans la direction parallèle à la plaque cuticulaire. Pour des amplitudes n'excédant pas quelques centaines de nanomètres, la relation $x = \gamma X$ est indépendante de X et est la même pour tous les stéréocils [Howard *et al*, 1988 ; Jacobs & Hudspeth, 1990]. Les valeurs numériques de γ sont données ci-dessous pour différents animaux.

Organe et animal	Référence	Valeur
Sacculle de la grenouille taureau	[Jacobs & Hudspeth, 1990]	0,14
Zone centrale de la cochlée de la tortue	[Hackney et al, 1993]	0,06
Utricule de la souris	[Stauffer et al, 2005]	0,05
Cochlée du rat, à une distance de 80 % de la base	Communication personnelle de R. Fettiplace	0,25

Tableau I-2 : Valeur du gain géométrique γ pour différents organes et animaux

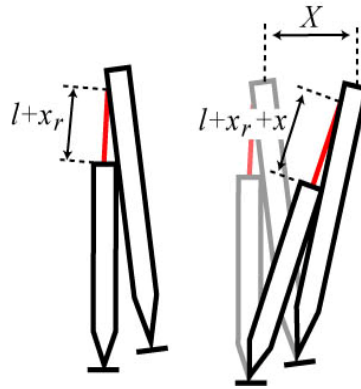


Figure I-9 : Mise sous tension du ressort de transduction lors d'une déflexion X de la touffe ciliaire. On n'a représenté sur ce schéma que deux stéréocils, et l'on a identifié le lien de bout de cils au ressort de transduction. l est la longueur du ressort d'extension à tension nulle, x_r son élongation au repos, et x son élongation supplémentaire induite par la déflexion X .

Dans le reste de ce manuscrit, nous adopterons la convention suivante : les grandeurs dénotées par une lettre minuscule seront celles mesurées selon l'axe du stéréocil ; les grandeurs dénotées par une lettre majuscule le seront le long de l'axe de stimulation. Une distance mesurée sur l'axe des stéréocils correspondra à une distance le long de l'axe de stimulation telle que $l = \gamma L$, pour une force $f = F/\gamma$, et pour une raideur $k = K/\gamma^2$. On a remarqué précédemment qu'un stimulus appliqué au sommet de la touffe ciliaire mettait en mouvement tous les stéréocils, et que la touffe ciliaire se comportait comme une unité. Nous ferons l'hypothèse dans la suite que tous les canaux au sommet de chaque stéréocil fonctionnent en parallèle et sont soumis à la même force.

D. L'adaptation

Tous les systèmes sensoriels possèdent un mécanisme d'adaptation, qui leur permet de rester sensibles aux petits stimuli transitoires même en présence d'un grand stimulus statique saturant. A titre d'exemple, le saccule de la grenouille taureau est capable de détecter des accélérations verticales du sol un million de fois plus petites que le champ de gravitation terrestre [Narins & Lewis, 1984].

De nombreux récepteurs sensoriels, comme les photorécepteurs ou les neurones olfactifs, utilisent des messagers secondaires lors de la transduction. Cette stratégie comporte, au prix de la rapidité, des avantages certains tels que la possibilité d'adjoindre à la voie biochimique de transduction des mécanismes d'amplification et de rétroaction permettant l'adaptation ou la désensibilisation. La transduction par les cellules ciliées ne fait pas appel à de tel processus ; celles-ci ont développé des mécanismes d'adaptation originaux, adaptés au caractère mécanique direct de la transduction.

D.1. L'adaptation restore la mécano-sensibilité d'une touffe ciliaire en présence d'un stimulus saturant

L'adaptation se manifeste dans le courant de transduction engendrée par une marche de déplacement imposée à la touffe ciliaire et observée aux temps longs après l'amorce de ce stimulus (chez la grenouille : [Eatock *et al*, 1987], chez la tortue : [Crawford *et al*, 1989], dans la cochlée des souris : [Kros *et al*, 1992 ; Russell *et al*, 1989], dans la cochlée du rat : [Kennedy *et al*, 2003]). En réponse à des stimuli positifs, le courant de transduction augmente tout d'abord rapidement, reflétant comme décrit précédemment l'ouverture des canaux de transduction, puis décroît (Figure I-11.A). À l'inverse, un stimulus négatif entraîne tout d'abord une diminution du courant qui traverse les canaux de transduction, mais dans les instants qui suivent la stimulation, celui-ci croît à nouveau en direction de sa valeur au repos. Ce processus ne résulte pas d'une désensibilisation des canaux de transduction : si, en présence d'une déflexion statique et après un délai nécessaire à la cellule pour adapter (10-100 ms) on impose une déflexion supplémentaire à la touffe ciliaire, on mesure à nouveau un courant de transduction. L'adaptation est due à la refermeture des canaux de transduction en présence d'un biais positif ou à leur réouverture en présence d'un biais de polarité opposée.

Des mesures du courant de transduction généré par des déflexions brèves en présence d'un déplacement statique montrent que l'adaptation se traduit par un glissement de toute la courbe instantanée courant/déplacement selon l'axe des déplacements dans la direction du déplacement statique imposé par le stimulus [Eatock *et al*, 1987], et sans déformation notable de cette courbe (Figure I-10). Le rôle du processus d'adaptation consiste donc à ramener la probabilité d'ouverture des canaux à leur valeur au repos, ce qui réinitialise la sensibilité de la touffe ciliaire aux stimuli transitoires.

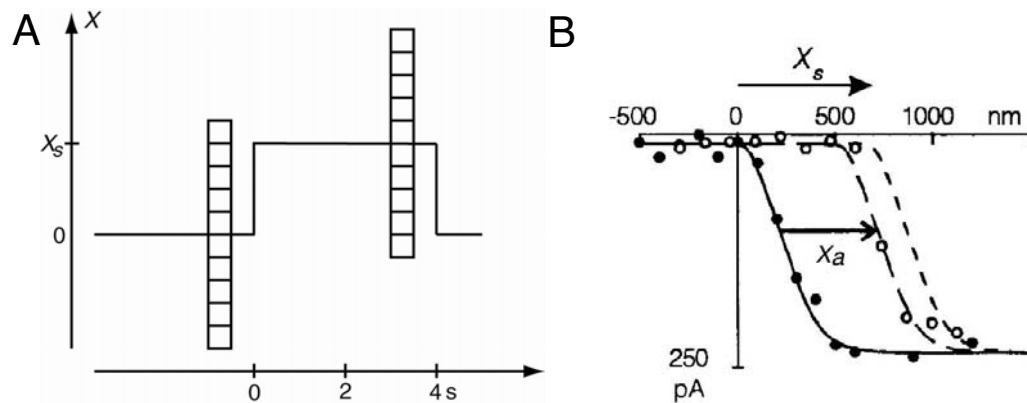


Figure I-10 : Glissement de la courbe courant/déplacement observé lors d'un stimulus prolongé. **A.** Méthode. Une série de marches de quelques millisecondes (dilatées et superposées ici) est imposée à la touffe ciliaire au repos afin de déterminer sa courbe courant/déplacement initiale. Puis une déflexion statique $X=X_s$ est imposée et la procédure répétée après un délai suffisant pour que la cellule s'adapte à ce stimulus statique. **B.** Résultat (● : courbe initiale, ○ : après adaptation). La courbe courant/déplacement s'est déplacée quasiment sans déformation d'une quantité X_a que l'on remarque être inférieure à X_s . [Shepherd & Corey, 1994].

Pour les déflexions qui ouvrent ou ferment une grande proportion des canaux, il a été noté que le processus d'adaptation n'était pas complet : le courant de transduction ne parvient pas à retrouver sa valeur au repos. Ceci se manifeste pour des déplacements de plus de 200 nm par un glissement de la courbe courant/déplacement inférieur à l'amplitude du stimulus statique [Shepherd & Corey, 1994], valant environ 80% de l'amplitude de la marche associée (voir figure I-10). A l'inverse, l'adaptation est pratiquement complète pour les petits stimuli [Kennedy *et al*, 2003 ; Wu *et al*, 1999].

D.2. Cinétique de l'adaptation

La dynamique du courant de transduction est complexe. Outre le fait que l'adaptation est complète pour les petites déflexions et incomplète pour les grandes, sa cinétique varie également avec l'amplitude du stimulus. Pour les petites déflexions, la décroissance du courant de transduction peut être ajustée par une fonction mono-exponentielle dont la constante de temps va de 42 μ s pour les cellules ciliées externes du rat [Ricci *et al*, 2005] à quelques millisecondes pour les cellules ciliées du saccule de la grenouille [Howard & Hudspeth, 1987]. Celle-ci semble également corrélée à la fréquence caractéristiques des stimuli pour lesquels la cellule est la plus sensible [Fettiplace & Ricci, 2003]. Pour des stimuli intenses, cette description devient insuffisante et une seconde exponentielle avec une

constante de temps d'un ordre de grandeur plus grande (10-100 ms) doit être adjointe à l'ajustement [Hacohen *et al*, 1989 ; Wu *et al*, 1999]. Lorsque le stimulus croît en amplitude, cette dernière composante supplante complètement la première (Figure I-11).

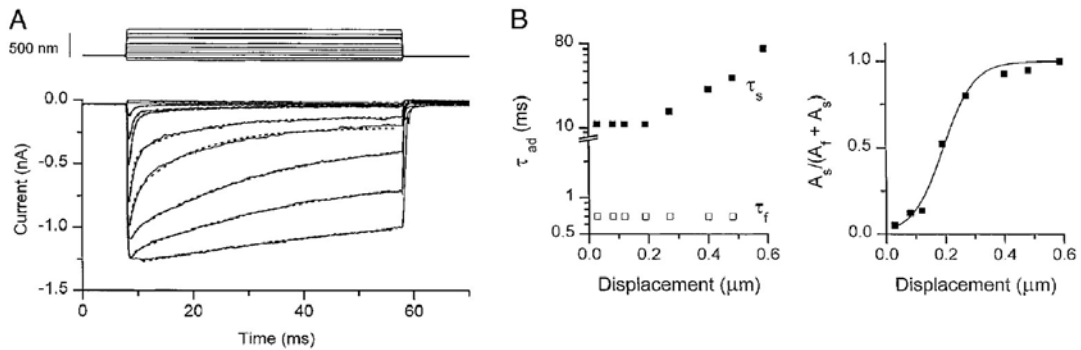


Figure I-11 : Dépendance de la cinétique d'adaptation en l'amplitude de stimulation, étudiée au travers de la décroissance du courant de transduction mesuré chez la tortue en présence d'une déflexion statique. **A.** Courant de transduction évoqué par une déflexion statique. Après avoir atteint son maximum (en valeur absolue), chaque courbe de courant est ajustée par deux exponentielles pour produire les graphes présentés en B. **B.** Gauche : constantes de temps lente τ_s et rapide τ_f , issues de l'ajustement. Droite : rapport de l'amplitude de l'exponentielle lente par la somme des amplitudes des deux exponentielles. Tiré de [Wu *et al*, 1999].

D.3. Régulation par le calcium

La cinétique d'adaptation dépend du calcium. Si l'on supprime l'influx de calcium dans la cellule en la dépolarisant fortement, l'adaptation disparaît : le courant de transduction garde une valeur constante [Assad *et al*, 1989 ; Crawford *et al*, 1991]. Si l'on diminue la concentration intracellulaire en calcium, soit en abaissant la concentration extracellulaire de calcium [Corey & Hudspeth, 1983a ; Eatock *et al*, 1987 ; Hacohen *et al*, 1989 ; Holt *et al*, 1997], en introduisant dans le corps cellulaire des chélateurs du calcium [Crawford *et al*, 1989 ; Ricci *et al*, 1998 ; Wu *et al*, 1999], ou en dépolarisant la cellule [Assad *et al*, 1989 ; Crawford *et al*, 1989], la cinétique de décroissance du courant de transduction en réponse à une déflexion positive est ralentie (Figure I-12.A).

Ces résultats suggèrent que, lors d'une déflexion positive, la composante du courant de transduction portée par le calcium promeut la refermeture des canaux, et est nécessaire à l'adaptation. Le glissement de la courbe courant/déplacement est probablement contrôlé par l'accrochage de calcium sur un site intracellulaire du complexe de transduction. La rapidité des cinétiques de l'adaptation indique que ce site doit être dans un rayon de 100 nm autour du pore du canal [Ricci *et al*, 1998].

En accord avec une localisation intracellulaire du site d'action du calcium, les taux d'adaptation lors d'une déflexion négative saturante, c'est-à-dire qui ferme la plupart des canaux de transduction, ne dépendent quasiment pas du calcium.

De plus, la probabilité d'ouverture au repos des canaux varie avec la concentration en calcium extracellulaire [Corey & Hudspeth, 1983b ; Crawford *et al*, 1991 ; Ricci & Fettiplace, 1998]. On observe expérimentalement que $P_o(0)$ décroît quand la concentration de calcium augmente (Figure I-12.B). Pour les cellules ciliées du saccule de la grenouille taureau, la probabilité d'ouverture pour des cellules ciliées laissées libres varie de 15 % pour $[Ca^{2+}]_{ext} = 4$ mM à plus de 50 % pour $[Ca^{2+}]_{ext} = 50$ μ M.

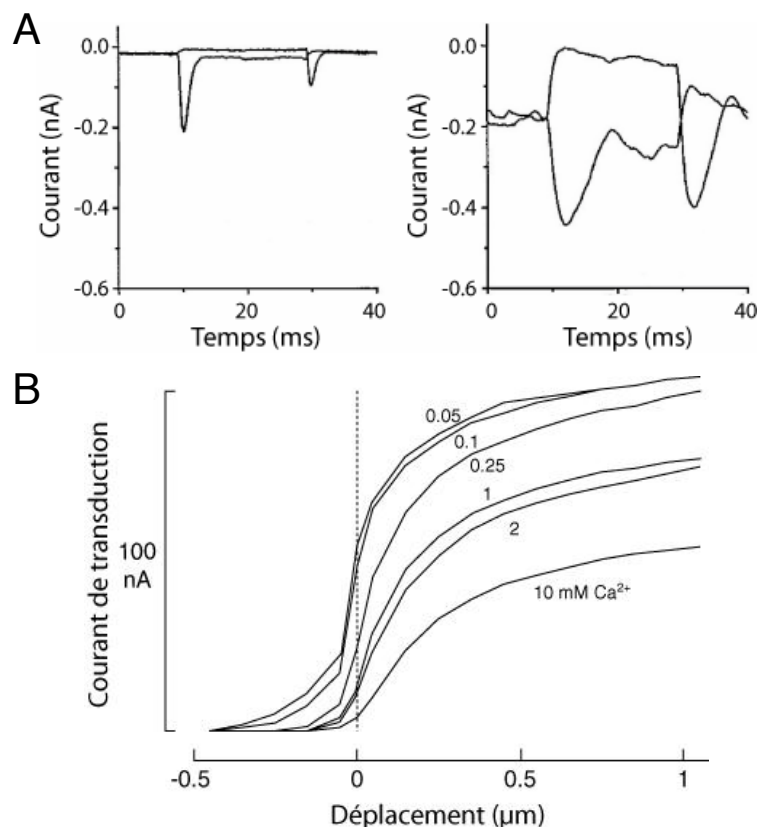


Figure I-12 : Régulation par le calcium du processus d'adaptation. **A.** Dépendance en calcium de la cinétique d'adaptation. Lorsque la concentration de calcium diminue de 2,8 mM (gauche) à 50 μ M (droite), la cinétique de décroissance du courant est considérablement ralentie. Adapté de [Ricci & Fettiplace, 1998]. **B.** Dépendance en calcium de la probabilité d'ouverture au repos. Lorsque $[Ca^{2+}]$ augmente de 50 μ M à 10 mM, le courant transépithélial normalisé mesuré au repos diminue. Adapté de [Corey & Hudspeth, 1983b].

D.4. Corrélats mécaniques de l'adaptation : relaxation et « twitch »

Lorsqu'on stimule une touffe ciliaire avec une fibre *flexible* et non plus en lui imposant un déplacement (fibre *rigide*), on peut observer des mouvements qui peuvent être complexes (Figure I-13) mais dont la cinétique est similaire à celle du processus d'adaptation. Pour les grandes déflexions, la touffe ciliaire exhibe une relaxation mécanique dans la direction du stimulus, avec un temps caractéristique de l'ordre de 30 ms [Howard & Hudspeth, 1987] (Figure I-13.A). Plongées dans la périlymphe où la concentration de calcium est élevée (4 mM) et en réponse à un échelon de stimulation positive, une touffe ciliaire peut exhiber un mouvement de recul – appelé « twitch » (Figure I-13.B) – de direction opposée à celle du stimulus qui lui a donné naissance et dans la milliseconde qui le suit [Benser *et al*, 1996 ; Howard *et al*, 1988 ; Ricci *et al*, 2000 ; 2002]. Comme ce mouvement s'oppose au stimulus, le twitch est un mouvement actif : la cellule ciliée puise dans ses réserves énergétiques pour fournir un travail mécanique. Ce mouvement de recul est associé à la composante rapide de l'adaptation et n'est en général obtenu que pour des déflexions positives, qui font augmenter la concentration intracellulaire de calcium. La composante lente du processus adaptatif est quand à elle associée à un mouvement de relaxation dans la direction du stimulus.

Le twitch est lié à la mécano-transduction : pour l'observer il faut stimuler la touffe ciliaire dans la direction de sensibilité et généralement dans le sens excitateur, et il disparaît si on bloque les canaux de transduction [Benser *et al*, 1996]. Il n'est observable que pour la gamme des stimulations qui ouvrent environ la moitié des canaux [Benser *et al*, 1996 ; Ricci *et al*, 2000] (Figure I-13.C). Comme pour le courant de transduction qui lui est associé, le twitch dépend de la concentration de calcium du milieu ionique dans lequel baignent les touffes ciliaires. Décroître la concentration extracellulaire en calcium ralentit la cinétique du twitch [Benser *et al*, 1996 ; Ricci *et al*, 2000], jusqu'à ce que celui-ci disparaisse si la concentration en calcium devient trop basse [Howard & Hudspeth, 1987].

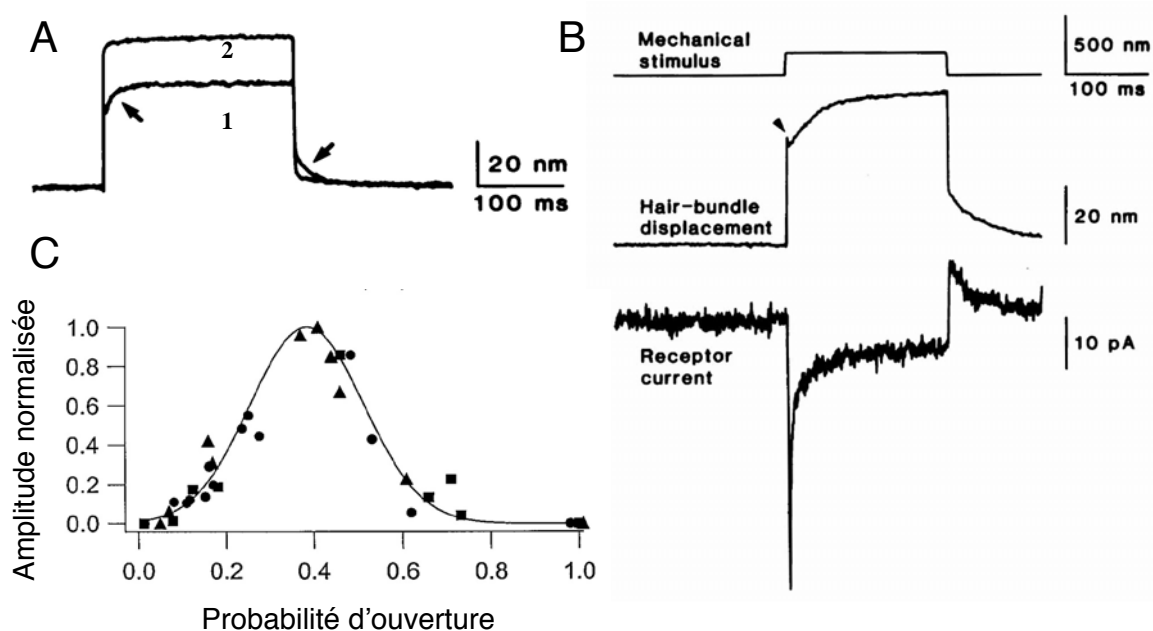


Figure I-13 : Corrélatés mécaniques de l'adaptation. **A.** Relaxation mécanique observée lors de la déflexion d'une touffe ciliaire par une fibre souple. 1 : La touffe ciliaire est stimulée dans sa direction de mécano-sensibilité ; on observe que son mouvement relaxe lentement pendant environ 30 ms après l'initiation et l'extinction du stimulus. 2 : On n'observe pas cette relaxation lorsque la cellule est stimulée orthogonalement à sa direction de mécano-sensibilité, et la touffe ciliaire apparaît plus souple. Tiré de [Howard & Hudspeth, 1987]. **B.** Lorsque la concentration de calcium est élevée, on peut observer en plus de cette relaxation mécanique un mouvement de recul en réponse à une stimulation excitatrice, le « twitch ». Ce mouvement négatif (indiqué par la flèche) apparaît conjointement à la décroissance rapide du courant après une stimulation positive [Howard & Hudspeth, 1987]. **C.** Amplitude normalisée du twitch en fonction de la probabilité d'ouverture mesurée chez la tortue. Le twitch n'est observable que pour la gamme des stimulations qui ouvrent ~50 % des canaux. Adapté de [Ricci et al, 2000].

Le twitch n'est observé que pour les déflexions suffisamment abruptes de la touffe ciliaire : il faut que la montée de la marche de stimulation soit plus rapide que la décroissance du courant due à l'adaptation [Benser *et al*, 1996]. Si ce n'est pas le cas, la touffe ciliaire parvient à adapter pendant l'application du stimulus, et la position de la touffe ciliaire relaxe sans exhiber de twitch. Dans les cellules externes de la cochlée du rat, le courant de transduction évoqué lors d'une stimulation par une fibre souple exhibe une adaptation avec une cinétique rapide, sans que l'on puisse observer de twitch [Kennedy *et al*, 2005]. Il est possible que les temps de montée des stimuli obtenus avec des fibres souples (environ 200 μ s) soient trop longs comparés au temps caractéristique de décroissance du courant (environ 150 μ s, mesuré dans [Kennedy *et al*, 2003] avec une fibre rigide) pour pouvoir provoquer ce mouvement actif.

D.5. Le modèle du moteur de l'adaptation

D.5.1. Le moteur de l'adaptation

Dans le cadre du modèle du « gating spring », l'ouverture des canaux de transduction en réponse à un stimulus positif est due à l'augmentation de la tension d'un élément élastique couplé mécaniquement à chaque canal. S'il existe un mécanisme qui relâche la tension qu'exercent ces ressorts de transduction en présence d'un stimulus statique, on comprend alors que les canaux vont se refermer. Le modèle du moteur actif postule un mouvement du complexe de transduction le long des stéréocils. L'adaptation *positive* (en réponse à une déflexion positive, c'est-à-dire qui tend à ouvrir les canaux) viendrait faire glisser le complexe de transduction vers la base des stéréocils, réduisant la tension dans le ressort de transduction et permettant ainsi la refermeture des canaux initialement ouverts. L'adaptation *négative* (en réponse à une déflexion négative) résulterait quand à elle de l'ascension du complexe de transduction le long des stéréocils, restaurant la tension dans le ressort de transduction et donc la probabilité d'ouverture des canaux (Figure I-14.A).

Dans le cadre de ce modèle, l'adaptation doit consommer de l'énergie. S'il est possible de diminuer la tension dans le ressort de transduction pour une déflexion positive simplement en glissant passivement le long de la membrane, un moteur doit pouvoir lui communiquer de l'énergie élastique en remontant le flanc du stéréocil lors de l'adaptation négative. D'autre part, la probabilité d'ouverture au repos, mesurée pour des cellules ciliées laissées libres, n'est pas nulle [Corey & Hudspeth, 1983b]. La tension au repos dans le ressort de transduction doit donc être suffisamment importante pour qu'une fraction non négligeable de ces canaux soit dans l'état ouvert, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme actif capable de maintenir cette tension en produisant du travail mécanique.

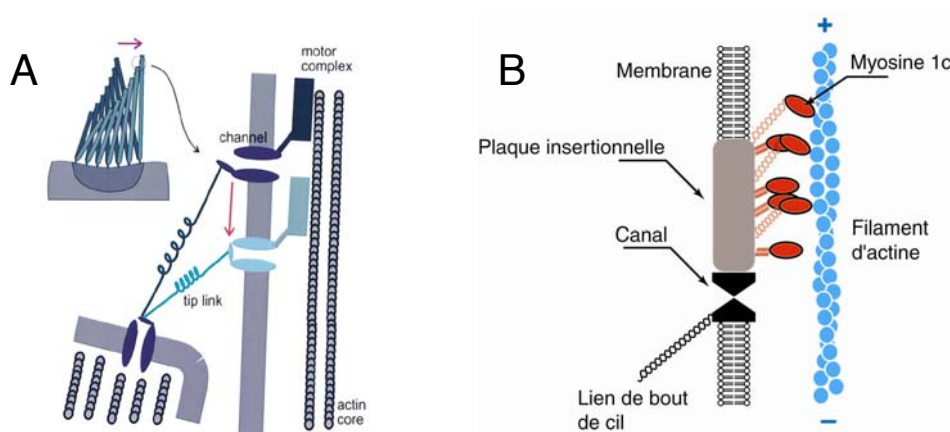


Figure I-14 : **A.** Schéma de principe de l'adaptation lente positive. Après une déflexion positive, l'excès de tension porté par l'élément élastique est relaxé lorsque le canal glisse vers la racine du stéréocil, ce qui permet sa refermeture. Les auteurs identifient ici le lien de bout de cil à l'élément élastique activant les canaux [Gillespie & Corey, 1997]. **B.** Schéma moléculaire du complexe de transduction.

D.5.2. Implication de la myosine 1c dans le phénomène d'adaptation

Plusieurs observations suggèrent que des moteurs moléculaires myosines pourraient sous-tendre le processus d'adaptation : d'abord les stéréocils sont remplis de filaments d'actine, le substrat naturel du mouvement des myosines. De plus, les vitesses d'ascension imputées à ce moteur ($\sim 1 \mu\text{m/s}$) moléculaire sont compatibles avec celles des myosines [Assad & Corey, 1992]. Enfin, certains analogues de l'ADP capables de les inhiber bloquent également l'adaptation lente [Gillespie & Hudspeth, 1993 ; Yamoah & Gillespie, 1996].

Parmi toutes les myosines que contiennent les stéréocils, la myosine 1c a été directement impliquée dans l'adaptation lente. Cette molécule est en quantité suffisante au sein du stéréocil [Gillespie *et al*, 1993] et est localisée près de la pointe des stéréocils [Garcia *et al*, 1998 ; Gillespie *et al*, 1993], c'est-à-dire à proximité des canaux de transduction. Des expériences combinant le génie génétique à des mesures d'électrophysiologie en ont apporté la confirmation [Holt *et al*, 2002 ; Stauffer *et al*, 2005]. Des myosines 1c mutées sur un acide aminé ont été exprimées dans une souris transgénique. Ces myosines mutées se comportent comme leurs homologues sauvages, mais possèdent une plus grande sensibilité à un analogue de l'ADP (NMB-ADP) qui vient les immobiliser sur le filament d'actine, ce qui permet de les bloquer spécifiquement. Les cellules ciliées de l'utricule exprimant ces myosines présentent une adaptation normale en présence d'ADP, mais les composantes lentes et rapides de l'adaptation sont fortement atténuées dès qu'on dialyse ADP-NMB dans ces cellules. La myosine 1c est donc associée avec le moteur d'adaptation (Figure I-14.B). Les données immunologiques [Gillespie *et al*,

1993], indiquent que l'on devrait trouver une centaine de ces molécules sur chaque plaque insertionnelle. L'évaluation des forces subies par le ressort de transduction indique qu'elles sont au nombre de quelques dizaines [Jaramillo & Hudspeth, 1993].

D.5.3. Formulation du modèle « moteur actif »

Dans le schéma présenté ci-dessus (Figure I-14), le moteur de l'adaptation a le rôle d'un lien intracellulaire qui vient relier le canal au cytosquelette du stéréocil. Au repos, la force d'arrêt f_a que vient générer dans chaque stéréocil le moteur d'adaptation équilibre la tension dans le ressort de transduction. Si l'on suppose pour simplifier que $x_r \gg d$, il vient $f_a \approx k_{GS} x_r$. L'équation I.1 montre alors que cette force d'arrêt détermine la probabilité d'ouverture au repos :

$$P_o(0) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta\mu - k_{GS} d x_r}{k_B T}\right)}$$

En présence d'une déflexion X de la touffe ciliaire, le moteur d'adaptation se déplace le long du flanc des stéréocils d'une quantité x_a mesurée par rapport à sa position au repos. Par convention, on choisit d'attribuer à x_a le signe positif pour les déplacements en direction de la racine des stéréocils. Comme noté précédemment, cette polarité du mouvement du moteur est obtenue pour les déflexions positives de la touffe ciliaire. Le moteur se déplace sur des échelles de temps qui sont beaucoup plus longues que celles de la transduction ; les canaux demeurent proches de l'équilibre thermique et leur probabilité d'ouverture obéit donc toujours à l'équation I.1. Le déplacement nécessaire pour obtenir une probabilité d'ouverture de 0,5 s'écrit maintenant :

$$X_0 = \frac{\Delta\mu}{Z} - \frac{x_r}{\gamma} + \frac{x_a}{\gamma} \quad (I.2)$$

Avec cette écriture, l'adaptation se traduit par un simple glissement selon l'axe des déplacements de la courbe probabilité d'ouverture/déplacement, sans déformation (Figure I-10). Dans toute la suite, on notera par $X_a = x_a/\gamma$ l'amplitude de ce glissement adaptatif, mesuré selon l'axe horizontal de stimulation de la touffe ciliaire.

Si l'on suppose que le moteur de l'adaptation est soumis à des forces qui sont proches de sa force d'arrêt, on peut effectuer un développement linéaire de sa relation force/vitesse autour de ce point [Assad & Corey, 1992 ; Martin *et al*, 2003 ; Nadrowski *et al*, 2004]. Dans un premier temps, on considère que le moteur n'est

soumis qu'à la tension exercée par le ressort de transduction. Comme cette tension ne dépend que de la différence $X - X_a$, il vient

$$\lambda_a \frac{dX_a}{dt} = T_{GS}(X - X_a) - F_a \quad (I.3)$$

où T_{GS} est la tension combinée de tous les ressorts de transduction, F_a est la force combinée d'arrêt du moteur d'adaptation, mesurée selon de l'axe de mécanosensitivité, et λ_a , homogène à une friction, est le coefficient de proportionnalité de ce développement linéaire.

L'état stationnaire initial est donné par l'équilibre entre la tension T_{GS} et la force F_a . L'équation I.3 montre que le moteur est capable de se déplacer pour restaurer cet équilibre en présence d'une déflexion X statique. Il réajuste la tension T_{GS} à sa valeur au repos, et produit donc une adaptation complète. Expérimentalement, on observe que pour des grandes déflexions, l'adaptation est incomplète (voir paragraphe D.1). Il existe donc un élément exerçant une force sur le moteur et ne dépendant pas de la tension dans le ressort de transduction. Les auteurs de [Shepherd & Corey, 1994] ont proposé de modéliser cet effet en ajoutant dans l'équation I.3 un terme de force, provenant d'un ressort d'extension, qui lie le canal de transduction directement au cytosquelette d'actine :

$$\lambda_a \frac{dX_a}{dt} = T_{GS}(X - X_a) - K_{ES} \times (X_a - X_{ES}) - F_a \quad (I.4)$$

où K_{ES} est la raideur combinée de cet élément pour tous les stéréocils, et $x_{ES} = \gamma X_{ES}$ est son extension au repos (pour $X_a = 0$). Pour rendre compte d'un taux d'adaptation de 80% observé chez la grenouille en réponse à des déflexions saturantes, K_{ES} doit valoir $\sim 0,25 \cdot K_{GS}$.

Le taux initial de l'adaptation (défini par la vitesse initiale à laquelle glisse la courbe courant/déplacement après l'amorce d'une marche de déplacement) dépend de l'amplitude et de la polarité du stimulus. Pour les déflexions positives, le taux d'adaptation mesuré dans le saccule de la grenouille taureau [Hacohen *et al*, 1989] dépend linéairement de X , ce que l'on peut expliquer simplement si on néglige la non-linéarité introduite par la transduction (voir le paragraphe C.3). Dans ce cas, la tension T_{GS} s'écrit :

$$\begin{aligned} T_{GS} &\approx N \gamma k_{GS} (x_r + x - x_a) \\ &= K_{GS} (X - X_a + x_r / \gamma) \end{aligned}$$

avec $K_{GS} = N \gamma^2 k_{GS}$ la raideur combinée des ressorts de transduction mesurée selon l'axe horizontal. Si l'on part de l'état stationnaire $X = 0$, $X_a = 0$ et $F_a = K_{GS} x_r / \gamma$, il vient pour une déflexion positive, dans les instants immédiatement après la stimulation :

$$\lambda_a \left. \frac{dX_a}{dt} \right|_{t=0} \approx K_{GS} X$$

En connaissant la raideur K_{GS} (valant environ 1 pN/nm, voir la section E) et en mesurant le taux initial d'adaptation, on déduit $\lambda_a \approx 10^{-2}$ pN.s/nm [Hacohen *et al*, 1989].

Pour les grandes déflexions négatives (de plus de 150 nm en valeur absolue), le taux d'adaptation ne dépend pas de l'amplitude du stimulus, et \dot{X}_a garde une valeur constante environ égale à $-10 \mu\text{m/s}$. Ceci suggère que pour ces déflexions, le ressort de transduction devient lâche et n'exerce pas de forces en compression. La tension T_{GS} s'annule alors, et le moteur d'adaptation se déplace vers le sommet des stéréocils à la vitesse déterminée par F_a/λ_a , ce qui conduit à $F_a \approx 100$ pN.

Les myosines, localisées dans l'espace intracellulaire juste derrière le pore du canal de transduction, voient leur environnement ionique changer lors d'une stimulation : la concentration locale en calcium au voisinage des moteurs augmente (respectivement diminue) lorsque l'on ouvre (respectivement ferme) les canaux de transduction. Pour rendre compte des effets du calcium sur le processus d'adaptation (paragraphe D.3), il a été proposé [Assad & Corey, 1992 ; Hacohen *et al*, 1989] que le calcium intracellulaire modifie les paramètres de la relation force/vitesse du moteur de l'adaptation (équation I.3). Même si à priori tous les paramètres (λ_a , K_{GS} , D ,...) peuvent dépendre du calcium, on peut interpréter simplement les effets du calcium sur l'adaptation en supposant que, lors d'une déflexion positive, la composante calcique du courant de transduction affaiblit le moteur d'adaptation en diminuant la force F_a [Nadrowski *et al*, 2004]. Si les myosines sont moins liées à l'actine, la force ascensionnelle que peut générer le moteur de l'adaptation décroît. Sous l'effet de la force extérieure, le moteur glisse le long des filaments d'actine, d'autant plus rapidement que la concentration de calcium est élevée. A l'inverse, une déflexion négative ferme les canaux, et la concentration de calcium à proximité des myosines décroît. Le moteur engendre alors une force plus grande et monte le long des filaments d'actine. Comme la concentration intracellulaire de calcium dans ce cas est celle obtenue pour les canaux fermés, on peut comprendre que les taux négatifs dépendent faiblement du calcium extracellulaire [Hacohen *et al*, 1989]. De la même manière, une diminution de la force d'arrêt des myosines avec le calcium permet d'interpréter les faibles probabilités d'ouverture au repos qui sont observées lorsque les touffes ciliaires sont immergées dans un milieu riche en calcium. Dans ce travail de thèse (voir le paragraphe F), on modélisera l'effet du calcium sur le moteur de l'adaptation en imposant que la force d'arrêt du moteur soit une fonction décroissante de la concentration en calcium.

D.6. Le modèle de la refermeture du canal promue par le calcium

D.6.1. Adaptation lente et adaptation rapide

L'activité d'un moteur moléculaire couplé au canal de transduction suffit-elle à expliquer tous les aspects du phénomène d'adaptation ? Trois observations ont conduit à considérer des mécanismes alternatifs. Premièrement, comme remarqué précédemment, la décroissance du courant de transduction évoquée par une déflexion statique est bien ajustée par la somme de deux exponentielles, une avec une constante de temps de l'ordre de la dizaine de millisecondes, l'autre avec une constante de temps qui peut être inférieure à la milliseconde. L'aptitude d'un moteur de type myosine à générer des mouvements à une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde ou inférieure est souvent contestée [Robles & Ruggero, 2001 ; Wu *et al*, 1999], sous le prétexte que le cycle ATPase de la myosine est beaucoup plus lent (50ms pour les myosines I [Pollard *et al*, 1991]). Deuxièmement, les deux composantes lentes et rapides se comportent différemment vis à vis des expériences où l'on perturbe le cycle ATPase des myosines. Lorsqu'on expose une touffe ciliaire à un inhibiteur de ce cycle tel que le vanadate ou la butanedione monoxime, la composante lente de l'adaptation disparaît, alors que la rapide persiste [Wu *et al*, 1999].

Enfin, la polarité du corrélât mécanique – le « twitch » - de la composante rapide de l'adaptation à un échelon de stimulation positive semble ne pas pouvoir être expliquée par le modèle du moteur actif (voir paragraphe D.5.3). Une déflexion positive de la touffe ciliaire induit en effet un influx de Ca^{2+} qui doit engendrer, dans le cadre de ce modèle, un glissement adaptatif du moteur vers la base des stéréocils. S'il relâche la tension des ressorts de transduction, ce glissement adaptatif devrait donc induire un mouvement de la touffe ciliaire dans la direction de la force extérieure alors que le twitch est de polarité opposée. Pour résoudre cette apparente contradiction, il a été proposé [Howard *et al*, 1988 ; Ricci *et al*, 2002] que le twitch résulte d'une interaction directe de la composante calcique du courant de transduction avec un élément du complexe de transduction qui favorise la refermeture du canal : en augmentant la tension dans le ressort de transduction lié au canal, cette refermeture rabattrait la touffe ciliaire en arrière. Dans ce cas, la source d'énergie de ce mouvement actif serait le gradient électrochimique de Ca^{2+} , maintenu *in fine* par l'action de pompes ATPases dans la membrane.

Ces observations suggèrent que deux mécanismes distincts d'adaptation coopèrent dans la cellule ciliée, l'un fondé sur le fonctionnement de myosines, l'autre ne dépendant pas du cycle ATPase de telles molécules. Ils sont dénommés respectivement « adaptation lente » et « adaptation rapide ».

D.6.2. Mécanismes proposés

Où se lie le calcium sur le complexe de transduction ? Comme celui-ci est mal connu, les mécanismes proposés sont tous fondés non sur des données moléculaires mais sur des extensions du modèle de transduction présenté plus haut (voir C.3). Dans tous les mécanismes suivants, l'augmentation de calcium intracellulaire entraîne *in fine* la fermeture du canal de transduction, mais l'élément du canal de transduction sur lequel le calcium varie.

Un premier modèle suppose que le calcium se lie directement au canal et change la différence d'énergie libre $\Delta\mu$ entre l'état ouvert et l'état fermé du canal de transduction, de telle manière à stabiliser l'état fermé du canal [Crawford *et al*, 1989 ; Howard & Hudspeth, 1987 ; 1988]. Une force plus grande est alors nécessaire pour ouvrir les canaux lorsque du calcium y est lié, ce qui se traduit par un changement d'origine de la courbe courant/déplacement : la tension dans le ressort de transduction qui a permis initialement d'ouvrir les canaux devient insuffisante pour les maintenir ouverts après l'augmentation de calcium intracellulaire et ceux-ci se referment. Si la touffe ciliaire est libre de se mouvoir, on devrait alors observer le mouvement bref du twitch. Dans le cadre de ce modèle, la courbe probabilité d'ouverture/déplacement n'est pas déformée par l'interaction du Ca^{2+} avec le complexe de transduction, mais simplement décalée suivant l'axe des déplacements ($\Delta\mu$ n'intervient que dans l'expression de X_0 dans l'équation I.1).

On peut également proposer que le canal est lié aux myosines par un élément qui change de conformation lorsque du calcium se lie à lui, de sorte à réduire rapidement la tension dans le ressort de transduction et donc permettre la refermeture des canaux [Nadrowski, 2004 ; Stauffer *et al*, 2005]. On peut modéliser cet effet dans le modèle de transduction proposé plus haut par une dépendance de x_r en le calcium dans l'équation I.1, ce qui revient à considérer que la longueur au repos du ressort de transduction est une fonction croissante du calcium intracellulaire. Là encore, la forme de la courbe probabilité d'ouverture/déplacement ne dépend pas du Ca^{2+} .

Une autre proposition est que le calcium se lie à un ressort intracellulaire en série avec le ressort de transduction, ou s'identifiant à lui s'il est intracellulaire, faisant décroître sa raideur et permettant la refermeture des canaux [Bozovic & Hudspeth, 2003 ; Howard & Spudich, 1996 ; Martin *et al*, 2003]. Ce changement de raideur modifie la valeur de Z la force de transduction, et altère la forme de la courbe probabilité d'ouverture/déplacement.

D.6.3. Comparaisons des modèles pour l'adaptation rapide

Eunice Cheung et David Corey [Cheung & Corey, 2005] ont mis au point une procédure expérimentale où le mouvement de recul (similaire au twitch) causé par l'adaptation rapide est produit par une dépolarisation suivi d'une repolarisation brutale qui force l'entrée rapide de calcium dans la cellule. Cette mesure est répétée pour différentes forces statiques appliquées à la touffe ciliaire pour obtenir la dépendance de l'amplitude du mouvement actif provoqué en cette force. Ces auteurs concluent que la forme de la courbe représentant l'amplitude du twitch en fonction de la force statique appliquée est compatible avec une dépendance de $\Delta\mu$ avec le calcium mais pas avec un changement conformationnel ou de la raideur du ressort de transduction induit par l'accrochage du calcium (Figure I-15) : un canal avec du Ca^{2+} accroché nécessite une force positive supplémentaire de ~ 3 pN pour être ouvert.

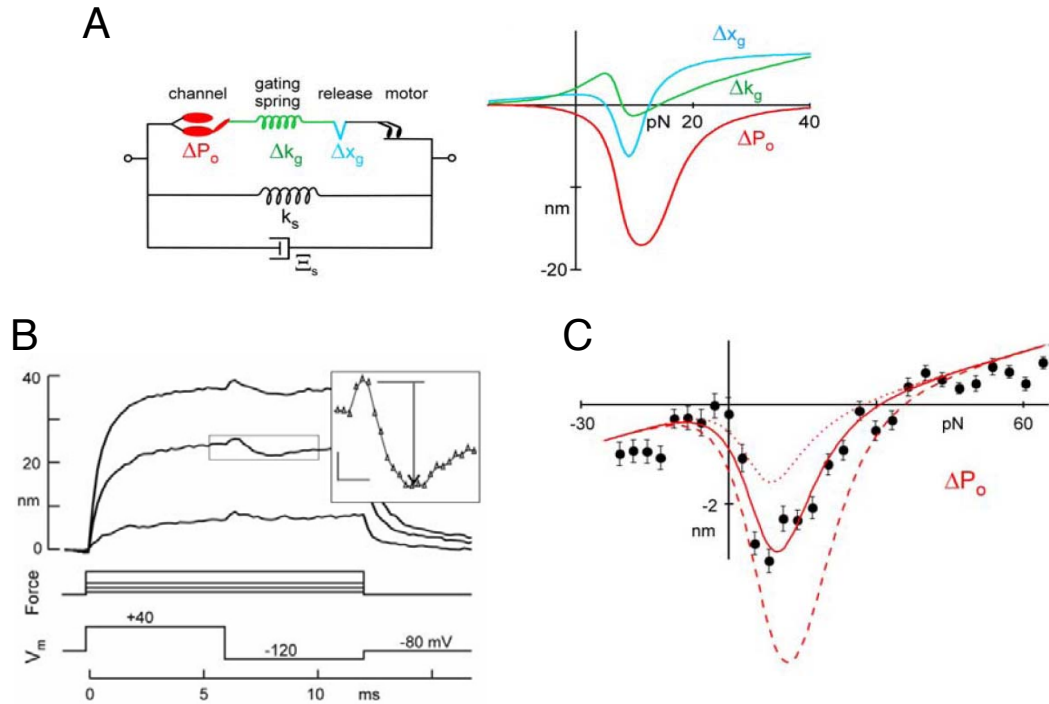


Figure I-15 : Méthode, proposée dans [Cheung & Corey, 2005], pour déterminer quel composant du complexe de transduction est sensible au calcium. **A.** Gauche : le canal est en série avec le ressort de transduction et un élément dont la longueur peut changer avec la concentration de calcium. k_s est le ressort d'extension et Ξ_s est la friction de la touffe ciliaire. Comme on n'observe que les mouvements brefs, on suppose que dans un laps de temps court, le moteur de l'adaptation reste immobile. Droite : amplitude du mouvement négatif prévu lorsque chacun des trois éléments $\Delta\mu$, k_g et x_g voit sa valeur changer sous l'effet de calcium, en fonction de la force statique appliquée à la touffe ciliaire. **B.** Protocole expérimental. La touffe ciliaire est dépolarisée et une force statique lui est appliquée. Lorsque l'adaptation a terminé sa course, la cellule est brusquement hyperpolarisée et un mouvement bref biphasique positif puis négatif est enregistré. Le mouvement positif est attribué à la dépendance en voltage d'un élément du canal non lié à la transduction et le mouvement négatif est attribué à l'adaptation rapide. **C.** Dépendance en force de l'amplitude de ce mouvement négatif. Seul le modèle où $\Delta\mu$ dépend du calcium permet l'interprétation de la courbe expérimentale.

Le laboratoire de Peter Gillespie s'est penché sur les modèles fondés sur une dépendance en calcium de l'énergie libre intrinsèque du canal et de l'allongement de la longueur au repos du ressort de transduction [Stauffer *et al*, 2005]. Les auteurs ont étudié l'influence de l'adaptation rapide sur l'adaptation lente. Selon que l'adaptation rapide ait pour origine un changement de $\Delta\mu$ entraînant une fermeture des canaux ou un allongement du ressort de transduction, la tension qui s'exerce sur les myosines juste après l'ouverture des canaux de

transduction n'est pas la même (Figure I-16). Si, après une déflexion positive, le calcium se lie au canal et le referme, la tension dans le ressort de transduction va augmenter (Figure I-16.B). À l'inverse, si le calcium se lie à un élément capable de s'allonger lorsque le calcium s'y lie, la tension dans le ressort de transduction va décroître (Figure I-16.C). Comme la cinétique du mouvement du moteur de l'adaptation (auquel on attribue l'adaptation lente) dépend de cette tension, en mesurant ces vitesses d'adaptation dans la gamme de déflexion pour laquelle l'adaptation rapide opère, on peut discriminer lequel des deux composants est sensible au calcium. Les auteurs mesurent la décroissance du courant de transduction après un déplacement en échelon de la touffe ciliaire et ajuste cette décroissance par la somme de deux exponentielles. L'exponentielle possédant une constante de temps courte (~ 1 ms) est supposée être uniquement due à l'adaptation rapide. Celle avec une constante de temps grande (~ 10 ms) est attribuée au mouvement des myosines le long des stéréocils. L'évolution de la vitesse initiale de l'adaptation lente en fonction de l'amplitude du stimulus ne semble compatible qu'avec un mécanisme où l'adaptation rapide est due à une relaxation conformationnelle d'un élément en série avec le moteur de l'adaptation.

Comme le révèle l'apparente contradiction entre les conclusions du groupe de D. Corey et celles du groupe de P. Gillespie, le mécanisme qui sous-tend l'adaptation rapide et son corrélat mécanique (le twitch) est encore mal compris.

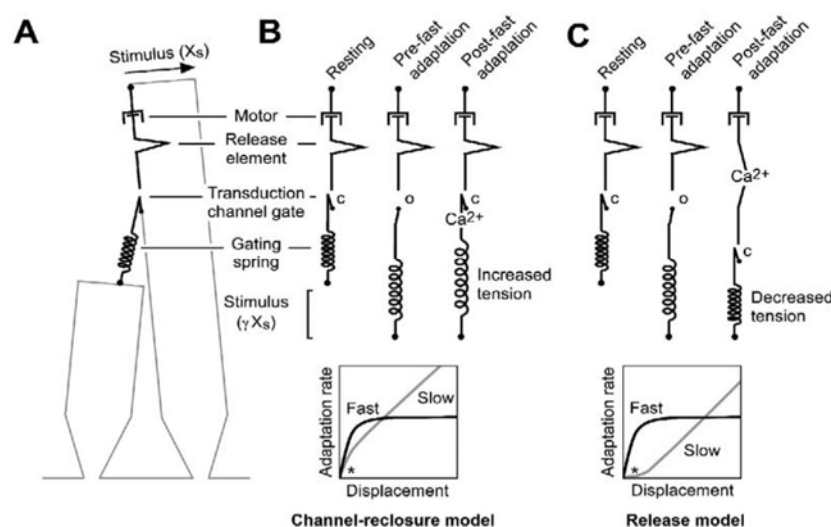


Figure I-16 : Paradigme proposé par [Stauffer et al, 2005]. **A.** Modèle mécanique utilisé : le ressort de transduction est en série avec le canal, un élément pouvant s'allonger et le moteur de l'adaptation lente. **B.** Cinétique de l'adaptation lente prévue dans le cas où le calcium se lie au canal et stabilise son état fermé. Il s'ensuit une tension supplémentaire dans le ressort de transduction, et donc une cinétique d'adaptation lente plus rapide dans la gamme où l'adaptation rapide opère. **C.** Dans le cas où le calcium se lie à un élément s'allongeant lorsqu'il lie du calcium, le ressort de transduction est détendu, ce qui ralentit la cinétique d'adaptation lente.

E. Propriétés mécaniques des touffes ciliaires

En mesurant les mouvements d'une touffe ciliaire en réponse à des forces extérieures, on peut caractériser les propriétés mécaniques de cette organelle mécano-sensible. Diverses méthodes sont utilisées pour exercer une force, parmi lesquelles la déflexion d'une fibre flexible [Crawford & Fettiplace, 1985 ; Flock & Strelioff, 1984 ; Howard & Hudspeth, 1987], dont l'extrémité est couplée au sommet de la touffe ciliaire. Si un déplacement connu Δ de la base de la fibre provoque un déplacement de la touffe ciliaire X , la force F exercée est donnée simplement par $F = K_F (\Delta - X)$ (voir le paragraphe II.B.2). Une autre méthode pour défléchir la touffe ciliaire consiste à appliquer une force de friction visqueuse en utilisant un jet de fluide [Géléoc *et al*, 1997]. Dans ce cas, la calibration de la force appliquée est en général compliquée, puisqu'elle dépend du champ de vitesse du liquide autour d'un objet dont la géométrie est complexe. Enfin, on peut également obtenir des informations sur les propriétés mécaniques d'une touffe ciliaire en mesurant les fluctuations de la position de la touffe ciliaire en l'absence de force extérieure [Bashtanov *et al*, 2004 ; Denk *et al*, 1989], grâce par exemple à un interféromètre différentiel à laser [Denk & Webb, 1990].

E.1. Raideurs de la touffe ciliaire

La raideur d'une touffe ciliaire peut être déterminée en lui appliquant une marche de déplacement et en mesurant la force nécessaire. Afin de ne pas être perturbé par le phénomène d'adaptation (qui va relaxer la tension dans le ressort de transduction), la force et la position doivent être mesurées suffisamment tôt (0,5-1 ms) après l'amorce du stimulus. A l'inverse, la raideur statique est obtenue en mesurant ces grandeurs 10 à 100 ms plus tard, lorsque le processus d'adaptation est accompli.

Il a été observé que la raideur statique d'une touffe ciliaire est inversement proportionnelle au carré de la hauteur à laquelle est appliquée le stimulus [Crawford & Fettiplace, 1985 ; Howard & Ashmore, 1986] et qu'elle croît avec le nombre de stéréocils [Howard & Ashmore, 1986], ce qui est cohérent avec la modélisation de la touffe ciliaire par un ressort pivotant où la contribution de chaque stéréocil est en parallèle de celle des autres. Une partie de la raideur totale mesurée provient des propriétés élastiques du faisceau d'environ 30 filaments d'actine qui ancre chaque stéréocil dans la plaque cuticulaire. Par un traitement enzymatique adéquat (subtilisine et BATPA), il est possible de cliver les liens latéraux qui connectent les

stéréocils entre eux. La raideur persistante, attribuée aux pivots, est indépendante de la direction de stimulation et vaut $K_{SP} \approx 0,2 \text{ pN/nm}$ ⁶ dans le saccule de la grenouille taureau, mesurée au niveau du bulbe du kinocil⁷ à une hauteur d'environ $L \approx 6,7 \mu\text{m}$ [Jaramillo & Hudspeth, 1993 ; Marquis & Hudspeth, 1997]⁸. Puisque les liens de bout de cils sont en moyenne alignés suivant l'axe de mécano-sensibilité maximale d'une cellule ciliée, une autre estimation de la raideur des pivots s'obtient en mesurant la réponse d'une touffe ciliaire perpendiculairement à sa direction de sensibilité ; les liens de bout de cils ne sont alors quasiment pas mis sous tension et les ressorts de transduction contribuent peu à la raideur. Ce faisant, on trouve une raideur de l'ordre de $0,5 \text{ pN/nm}$ [Howard & Hudspeth, 1987], plus grande que celle reportée plus haut. Il est probable que la différence s'explique par le fait que les liens de bout de cil ne sont pas tous exactement parallèles à la direction de sensibilité maximale, et qu'une déflexion qui lui est perpendiculaire en mettrait tout de même un certain nombre sous tension.

Pour préserver l'intégrité mécanique des liens de bout de cil, il est souvent nécessaire d'appliquer un traitement enzymatique (subtilisine) qui élimine la plupart des autres liens latéraux [Jacobs & Hudspeth, 1990]. En soustrayant la contribution des pivots à la raideur totale d'une touffe ciliaire mesurée dans ces conditions, on obtient donc une estimation de la contribution K_{GS} des liens de bout de cils que l'on assimile aux ressorts de transduction. Les estimations varient beaucoup d'une référence à l'autre [Howard & Hudspeth, 1987 ; Jaramillo & Hudspeth, 1993 ; Marquis & Hudspeth, 1997], probablement parce que, liés au très fragile complexe de transduction, l'état des ressorts de transduction dépend grandement des dommages infligés aux cellules lors de la préparation des organes. Les mesures la placent dans la gamme $K_{GS} \approx 0,5\text{--}1 \text{ pN/nm}$ ⁹ pour les cellules ciliées du saccule de la grenouille.

La raideur totale mesurée immédiatement après l'amorce du stimulus est la somme des deux contributions (dans une gamme de déplacement où les canaux restent tous ouverts où tous fermés, voir section suivante) : $K_{\infty} = K_{GS} + K_{SP}$. Le processus d'adaptation vient relaxer la tension dans le ressort de transduction ; donc au bout du temps nécessaire à son accomplissement, on devrait mesurer une raideur statique inférieure et égale à K_{SP} si l'adaptation était complète. Or l'adaptation est incomplète (voir D.1) : la tension dans le ressort de transduction n'est pas

⁶ K_{sp} : « stereociliary-pivot stiffness »

⁷ Sauf mention contraire, toutes les mesures et stimulations reportées ici sont faites en ce point et dans la direction de sensibilité de la touffe ciliaire.

⁸ Les auteurs de la première référence rapportent une valeur quantitativement plus grande. Ceci est peut être dû à leur protocole, où BAPTA est éjectée par iontophorèse (voir II.B.5) et par là, peut être en quantité insuffisante pour cliver tous les liens de bout de cil.

⁹ K_{gs} : « gating spring stiffness »

totalement relaxée, et on mesure une raideur statique aux alentours de $K_{stat} \approx 0,6\text{--}0,9$ pN/nm [Howard & Hudspeth, 1987].

E.2. Assouplissement dû à la transduction

Le modèle du « gating-spring » associe la tension dans un élément élastique – le ressort de transduction – à la probabilité d’ouverture des canaux (voir le paragraphe C.3). En conséquence, un changement de la probabilité d’ouverture des canaux doit modifier la tension dans les ressorts de transduction. Supposons que l’on maintienne les canaux fermés et que l’on mesure la raideur de celle-ci dans la direction de stimulation. On mesurera la raideur du ressort de transduction plus la raideur des pivots. Mais si pour une certaine gamme de stimuli les canaux viennent à s’ouvrir, on peut s’attendre à une diminution de la raideur due à leur ouverture, de la même manière que la tension mesurée à l’extrémité d’un élastique attaché à une porte décroît lorsque celle-ci s’ouvre. Ce phénomène, dénommé assouplissement dû à l’ouverture de canaux¹⁰, est effectivement observé [Howard & Hudspeth, 1988] : la touffe ciliaire apparaît plus souple dans la gamme des déplacements où les canaux s’ouvrent (Figure I-17), et cet effet disparaît lorsque l’on bloque les canaux par une drogue. Cette observation suggère que c’est bien l’ouverture et la fermeture des canaux qui sont à l’origine de l’assouplissement non-linéaire de la touffe ciliaire.

¹⁰
« gating compliance »

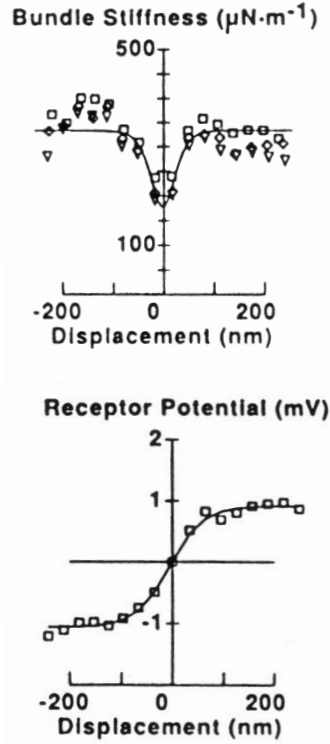


Figure I-17 : Raideur dynamique et potentiel récepteur mesurés sur une touffe ciliaire du saccule de la grenouille taureau. Tiré de [Howard & Hudspeth, 1988].

E.2.1. Formulation mathématique

On se place dans la situation idéalisée où l'on mesure la raideur de la touffe ciliaire sans que le moteur d'adaptation ne vienne relaxer le ressort de transduction. On a alors $x_a = 0$ et la force moyenne $\langle f_1 \rangle$ qui s'exerce sur un ressort de transduction s'écrit (avec les mêmes notations que pour la section C.3) :

$$\begin{aligned} \langle f_1 \rangle &= P_o \frac{\partial G_{el}^{ouvert}}{\partial x} + (1 - P_o) \frac{\partial G_{el}^{fermé}}{\partial x} \\ &= k_{GS} \left(x + x_r + \frac{d}{2} - d P_o \right) \end{aligned}$$

Pour N complexes tous identiques et fonctionnant en parallèle, la force F qui doit être appliquée à la touffe ciliaire pour la maintenir à une position X est donnée par :

$$F = K_{SP}(X - X_{SP}) + N k_{GS} \gamma \left(\gamma X + x_r + \frac{d}{2} \right) - N Z P_o \quad (I.5)$$

où X_{SP} est la position qu'aurait la touffe ciliaire si l'on avait clivé tous ses liens de bout de cil. Cette force est la somme de deux termes : le premier reflétant la contribution de la raideur des pivots, le second celle des ressorts de transduction. Si

l'on écrit $K_{GS} = N\gamma^2 k_{GS}$ la raideur combinée de tous les ressorts de transduction mesurée selon l'axe de sensibilité et $K_{\infty} = K_{GS} + K_{SP}$ la raideur totale de la touffe ciliaire lorsqu'on bloque les canaux. On peut écrire :

$$F = K_{\infty} X - NZ P_o + F_o \quad (I.6)$$

On en déduit la raideur dynamique associée :

$$\begin{aligned} K_{HB} &= \frac{\partial F}{\partial X} \\ &= K_{\infty} - \frac{NZ^2}{k_B T} P_o (1 - P_o) \end{aligned} \quad (I.7)$$

L'équation (I.6) est non linéaire, et le second terme, toujours négatif, traduit l'assouplissement dû à la transduction ; la touffe ciliaire apparaît plus souple dans la gamme des déplacements où l'on ouvre ou ferme les canaux. Ce phénomène n'est pas observé lorsque les canaux sont maintenus ouverts ou fermés [Howard & Hudspeth, 1988] et son amplitude dépend de la force de transduction Z .

E.2.2. Mesures des caractéristiques du complexe de transduction

Les mesures de la raideur d'une touffe ciliaire sont réalisées en appliquant une série de déplacement en échelon à la touffe ciliaire et en mesurant la force nécessaire pour les obtenir. La raideur dynamique instantanée est mesurée juste après la marche de déplacement, après un délai permettant l'activation des canaux de transduction et la disparition de la contribution visqueuse de la force appliquée, mais avant que l'adaptation ne relaxe significativement le ressort de transduction. Pour les cellules ciliées de la grenouille taureau, les mesures sont typiquement effectuées 2 ms après l'initiation du stimulus (voir la section II.B.4). L'ensemble des points (X, F) constitue une courbe force/déplacement, qui reflète les caractéristiques non-linéaires de la transduction.

Dans le cadre du modèle du ressort de transduction, avec un canal qui ne possède que deux états, l'équation (I.6) peut être utilisée pour ajuster les mesures de courbes force/déplacement et estimer la valeur des paramètres K_{∞} , Z , N , desquels on peut déduire la forme de la fonction $P_o(X)$. L'état mécanique d'une cellule et sa réponse à une stimulation seront entièrement caractérisées par la donnée des deux fonctions sus-citées $F(X)$ et $P_o(X)$. A partir de ces mesures et à condition de connaître K_{SP} et γ , on peut déduire les grandeurs d et k_{GS} par les relations suivantes :

$$k_{GS} = \frac{K_{GS}}{N \gamma^2} \quad \text{et} \quad d = \frac{Z}{\gamma k_{GS}}$$

Les prédictions numériques de [Sotomayor *et al*, 2005] indiquent que l'élasticité prévue pour les domaines ankyrines du canal TRPA1 sont de l'ordre du pN/nm et ne sont donc compatibles avec les mesures présentées ci-dessous.

Référence	Contexte	K_{∞} (pN/nm)	N	d (nm)	k_{GS} (pN/nm)
[Howard & Hudspeth, 1988]	sacculé de la grenouille taureau [Ca ²⁺] = 4 mM (périmpne) un compartiment	$0,930 \pm 0,370$	85 ± 45	4 ± 2	0,500
[Martin <i>et al</i> , 2000]	sacculé de la grenouille taureau [Ca ²⁺] = 250 μ M (périmpne) déplacement imposé, deux compartiments	$0,680 \pm 0,360$	47 ± 31	$8,2 \pm 1,5$	$0,570 \pm 0,250$
[Kennedy <i>et al</i> , 2005]	cellules externes de la cochlée du rat, [Ca ²⁺] = 1,5 mM un compartiment	3,0	39		

Tableau I-3 : Caractéristiques mécaniques des touffes ciliaires pour différents organes et animaux

E.2.3. Raideur négative

Les valeurs de d obtenues chez la grenouille apparaissent trop grandes pour simplement refléter l'ouverture du canal de transduction. Il a été proposé que le pore du canal soit lié au ressort de transduction par un levier moléculaire d'identité inconnue dont le changement de conformation provoqué par l'ouverture du canal permettrait d'amplifier le mouvement du canal lui-même. Notons que la valeur de d dépend également des conditions auxquelles on soumet les cellules. Dans les expériences décrites dans [Howard & Hudspeth, 1988], les cellules sont plongées entièrement dans la périmpne où la concentration de calcium est 4mM, et on mesure $d = 4$ nm. Les conditions des expériences rapportées par [Martin *et al*, 2000] sont différentes : les cellules sont placées dans une cuve à deux compartiments qui permet de mimer les conditions ioniques observées *in vivo*. La paroi basolatérale des cellules ciliées est plongée dans la périmpne alors que leur touffe ciliaire baigne dans l'endolpne ([Ca²⁺] = 250 μ M) ; on mesure alors $d = 8$ nm. Ces mesures suggèrent donc que d dépend du calcium extracellulaire. Notons que ce résultat dépend de l'hypothèse selon laquelle la raideur des pivots est indépendante du calcium.

L'assouplissement dû à la transduction peut être suffisamment important pour rendre la raideur dynamique de la touffe ciliaire, définie par l'équation (I.7), localement négative. Celle-ci a un minimum en la position X telle que $P_o = \frac{1}{2}$ qui vaut

$$K_{\min} = K_{SP} + K_{GS} \left(1 - \frac{K_{GS} D^2}{4Nk_B T} \right)$$

Ce minimum sera négatif si la force de transduction est suffisamment importante :

$$Z > \sqrt{4N k_B T K_\infty} \quad (I.8)$$

Avec les valeurs citées dans le tableau I-3, on voit que la condition de raideur négative est réalisée pour les paramètres mesurés en endolympe, mais pas pour ceux mesurés en périlympe. Placées dans un environnement ionique similaire à celui rencontré *in vivo*, les touffes ciliaires du saccule de la grenouille taureau exhibent une zone de raideur négative dans leur caractéristique force/déplacement [Martin *et al*, 2000].

E.2.4. Remarque : non linéarité mécanique et gamme de sensibilité mécano-électrique

Dans l'équation I.6, le seul terme dépendant de manière non linéaire de X est $-N Z P_o$. Les non linéarités dans la relation force/déplacement d'une cellule et la transduction des canaux sont donc intimement liés : les effets non-linéaires mécaniques ne se manifestent que dans la gamme des déplacements pour laquelle la probabilité d'ouverture varie, soit dans la gamme de sensibilité mécano-électrique de la touffe ciliaire. Plus précisément, dans le cadre de la modélisation du canal par deux états, la zone non linéaire est centrée en le déplacement X_0 pour lequel $P_o = 0,5$, et la relation F/X est symétrique par rapport au point ayant cette abscisse (Figure I-18). Ce couplage mécano-électrique est univoque : pour une position du moteur X_a fixée, à chaque valeur de P_o correspond une et une seule position sur la courbe F/X .

Lorsque la relation F/X d'une touffe ciliaire renferme une zone instable de raideur négative, il existe toute une gamme de probabilités d'ouvertures interdites (Figure I-18.B). Si la probabilité d'ouverture au repos des canaux de transduction qui est atteinte dans l'état stationnaire se situe dans cette gamme, cet état stationnaire ne peut être stable. Comme on le verra plus loin, cette caractéristique inhabituelle pour des objets biologiques est au cœur d'un mécanisme d'oscillations spontanées de la touffe ciliaire (voir la section F).

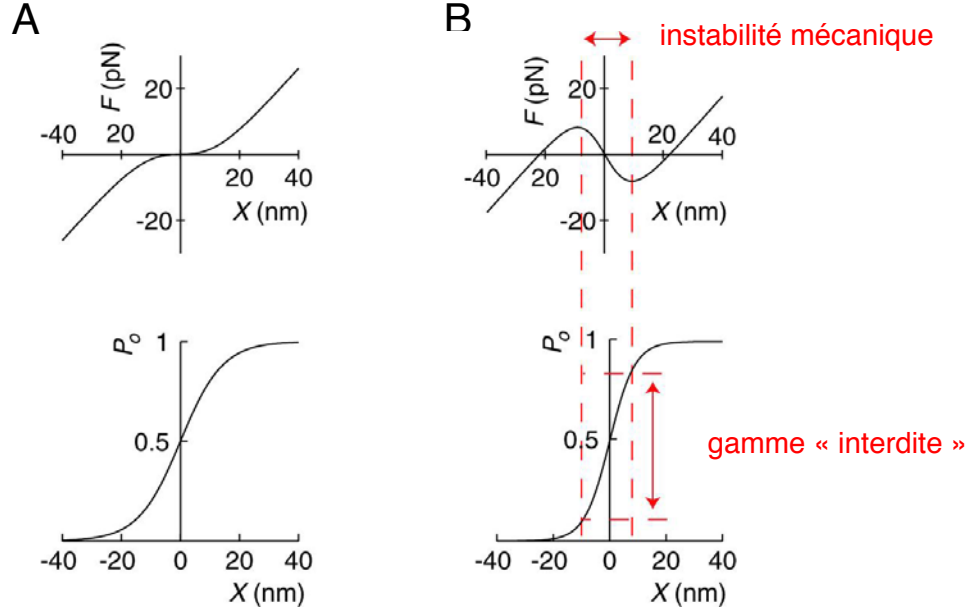


Figure I-18 : Courbes F/X et P_o/X théoriques, calculées grâce aux équations I.15 et I.6 pour deux ensembles de paramètres différents ($K_{GS}=0,8$ pN/nm, $K_{SP}=0,2$ pN/nm, $N=50$, $k_B T=4$ zJ, **A** : $D=35$ nm, **B** : $D=56$ nm). La zone non linéaire de la relation force/déplacement est centrée en le déplacement pour lequel $P_o=0,5$, et est symétrique par rapport au point ayant cette abscisse. Dans le cas **A** toutes les positions et probabilités d'ouverture sont stables alors que dans le cas **B** il existe une gamme de positions et de probabilités d'ouvertures que la cellule ciliée ne peut atteindre à l'état stationnaire.

E.3. Friction sur la touffe ciliaire

Le coefficient de friction $\lambda = \lambda_h + \lambda_c$ de la touffe ciliaire peut s'écrire comme la somme d'une contribution hydrodynamique λ_h , qui dépend de la viscosité du fluide et de la géométrie de la touffe ciliaire, et d'une contribution λ_c provenant du caractère stochastique de l'activation des canaux [Nadrowski *et al*, 2004].

Les chocs moléculaires des molécules du fluide dans lequel la touffe ciliaire est immergée occasionnent des fluctuations browniennes de position. Leur contribution peut être modélisée par une force stochastique η_h appliquée à la touffe ciliaire telle que $\langle \eta_h(t) \eta_h(0) \rangle = 2k_B T \lambda_h \delta_D(t)$ où $\delta_D(t)$ est la distribution de Dirac [Nadrowski *et al*, 2004] et λ_h est le coefficient de friction hydrodynamique. La mesure des fluctuations de position d'une touffe ciliaire conduit à une estimation de ce coefficient pour des touffes ciliaires du saccule de la grenouille taureau, dans des conditions où la friction hydrodynamique domine et chaque touffe ciliaire se comportent comme un oscillateur sur-amorti, donnent une valeur de $\lambda_h \sim 1,3 \cdot 10^{-4}$ pN.s/nm [Denk *et al*, 1989]. Cette valeur est sensiblement plus grande que celle donnée par la friction sur une sphère suivant la loi de Stokes et de taille

comparable (pour 5 μm de diamètre on trouve $\lambda_h \approx 5.10^{-5}$ pN.s/nm), ce qui est probablement le reflet de la géométrie complexe de la touffe ciliaire.

Chaque canal de transduction fluctue entre son état ouvert et son état fermé. Comme un canal de ce type est couplé au ressort de transduction, ces fluctuations génèrent une force stochastique η_c . Dans la limite où l'on suppose que le temps d'équilibration des canaux τ_c est beaucoup plus rapide que les autres temps caractéristiques de la touffe ciliaire, cette force obéit à la loi [Nadrowski *et al*, 2004] :

$$\langle \eta_c(t) \eta_c(0) \rangle \approx N Z^2 P_o (1 - P_o) \tau_c \delta(t)$$

En supposant que les canaux de transduction sont suffisamment rapide pour rester proche de l'équilibre thermique, le théorème de fluctuation-dissipation permet de relier ces fluctuations à un coefficient de friction λ_c tel que $\langle \eta_c(t) \eta_c(0) \rangle = 2k_B T \lambda_c \delta_D(t)$. Pour les cellules ciliées du saccule de la grenouille taureau ayant leur touffe ciliaire plongée dans l'endolymphe, l'estimation théorique de λ_c suggère que la contribution des canaux domine dans l'expression de λ , et lui confère une valeur d'environ 3.10^{-3} pN.s/nm.

F. Oscillations spontanées

Lorsque les cellules ciliées du saccule de la grenouille taureau sont immergées dans une chambre à deux compartiments permettant de reproduire les conditions ioniques rencontrées *in vivo*, leur touffes ciliaires oscillent spontanément [Martin *et al*, 2003 ; Martin & Hudspeth, 1999]. Ces oscillations ont été également observées chez la tortue [Crawford & Fettiplace, 1985] et très sporadiquement chez le poulet (Martin & Hudspeth, données non publiées), mais ont été documentées en détail seulement chez la grenouille ; nous nous limiterons ici aux résultats concernant cette espèce.

Ces oscillations sont lentes (5-50 Hz), amples (10-80 nm) et clairement biphasiques : une excursion lente dans une direction est suivie d'un brusque mouvement dans la direction opposée (Figure I-19.A). Elles sont réversiblement stoppées par l'application de gentamicine (qui bloque les canaux de transduction) et de drogues connues pour interférer avec le cycle ATPase des myosines, et ne sont observables que dans une certaine gamme de la concentration extracellulaire de calcium ($\sim 100 \mu\text{M}$ – $\sim 1 \text{ mM}$). Elles parviennent à mettre en mouvement une fibre flexible tant que sa raideur reste inférieure à environ 1,5 pN/nm. Enfin, le kinocil ne semble pas jouer de rôle déterminant dans le mécanisme qui sous-tend ces oscillations, car elles sont toujours observées lorsqu'il est séparé de la touffe ciliaire et maintenu plaqué contre la surface apicale à l'aide d'un barreau rigide [Martin *et al*, 2003]. Les oscillations sont bruitées, mais il a été démontré

formellement qu'elles sont sous-tendues par un mécanisme actif nécessitant une source d'énergie au sein de la cellule [Martin *et al*, 2001].

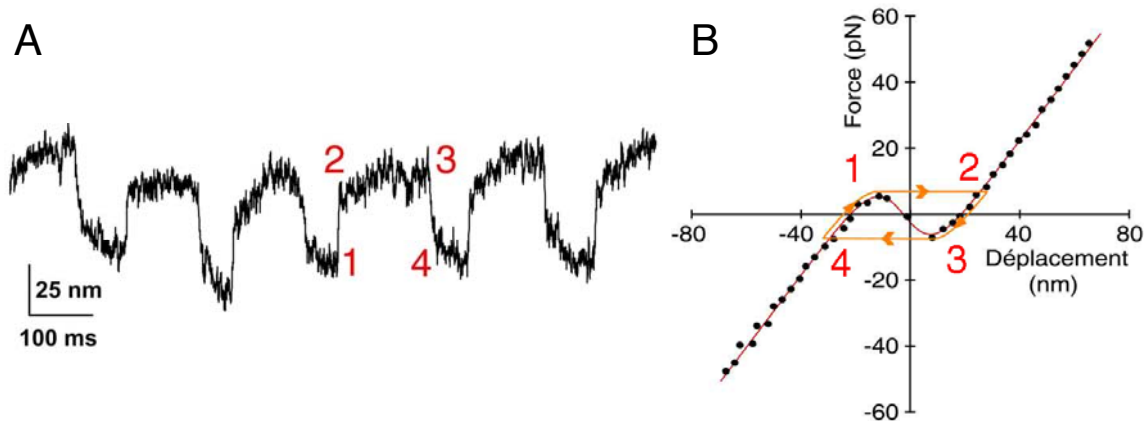


Figure I-19: **A.** Forme générale des oscillations. **B.** Dans le cadre du modèle proposé par [Martin *et al*, 2000], les oscillations spontanées résultent de l'activité du moteur d'adaptation couplée à l'existence d'une zone de raideur négative dans la caractéristique force/déplacement de la touffe ciliaire. Cette zone de raideur négative correspond à une gamme de probabilité d'ouverture au repos interdite. Pour une cellule oscillante, la probabilité d'ouverture au repos déterminée par le moteur de l'adaptation est justement dans cette gamme. 1→2 Si l'on part d'une position trop négative, l'adaptation cherche à ramener la touffe ciliaire vers la position $X=0$ du graphe, jusqu'à ce qu'au point 1 une instabilité est rencontrée. La touffe ciliaire ne peut résider dans la zone instable et vient se placer au point stable suivant en 2. Il résulte de ce saut un mouvement brusque positif de la touffe ciliaire. 2→3 La touffe ciliaire est maintenant en une position trop positive par rapport à son point de fonctionnement, le moteur d'adaptation va glisser le long du stéréocil et refermer les canaux, ce qui se traduit mécaniquement par la partie 2-3 de sa caractéristique force/déplacement. Il s'ensuit un mouvement lent de la touffe ciliaire. 3→4 Comme précédemment, on rencontre la zone instable, que la touffe ciliaire traverse brusquement, ce qui entraîne un mouvement rapide négatif. Adapté de [Martin *et al*, 2000].

Quel est le moteur de l'oscillation ? Les myosines impliquées dans le phénomène d'adaptation sont le meilleur candidat. Un modèle, très proche de celui décrit en F, où ce processus s'associe avec la raideur négative permet de décrire ces oscillations [Martin *et al*, 2000]. Pour une concentration de calcium extracellulaire donnée, la compétition entre la tension dans le ressort de transduction et la force moyenne que peuvent générer les myosines définit une probabilité d'ouverture au repos, à laquelle correspond une position particulière de la touffe ciliaire sur sa courbe caractéristique force/déplacement (Figure I-18). Si celui-ci est au sein de la zone instable de la courbe F/X , lieu des points où la raideur est négative, la touffe ciliaire ne peut jamais atteindre la quiescence (Figure I-19). L'instabilité rejette la

touffe ciliaire en dehors de cette zone et l'adaptation cherche constamment à l'y ramener.

L'analyse quantitative du mouvement d'une touffe ciliaire entraînant dans son oscillation une fibre souple a montré que la cellule suppléait de l'énergie, à hauteur d'environ 80.10^{-21} J par cycle [Martin & Hudspeth, 1999]. Toutefois, ces calculs ont été faits en supposant que la friction était dominée par la contribution hydrodynamique. Une estimation des différentes contributions au terme de friction [Nadrowski *et al*, 2004] suggère que dans les conditions utilisées, elle est dominée par le clapotement du canal (voir E.3). L'énergie de 80.10^{-21} J par cycle serait donc une sous-estimation du travail effectué par la cellule.

Il a été montré que ces oscillations étaient capables d'offrir une amplification sélective en fréquence [Martin & Hudspeth, 1999 ; 2001]. La cellule amplifie sa réponse mécanique aux stimuli oscillants dont la fréquence est proche de celle des oscillations spontanées. Cette amplification est accompagnée d'une compression non-linéaire de la réponse de la touffe ciliaire [Martin & Hudspeth, 2001] qui, comme dans la cochlée, est bien décrite par une loi de puissance et pourrait être le résultat d'un mécanisme d'amplification opérant à proximité d'une bifurcation de Hopf.

G. Un modèle simple de la mécanique d'une touffe ciliaire

G.1. Formulation

Dans la suite de ce travail, nous reprendrons une description utilisée par Franck Jülicher, Pascal Martin et Björn Nadrowski lors du travail de thèse de ce dernier [Nadrowski, 2004 ; Nadrowski *et al*, 2004]. Ce modèle est lui même une version simplifiée d'un modèle développé dans le laboratoire de Jim Hudspeth [Martin *et al*, 2003]. Les deux grandeurs d'intérêt sont la déflexion de la touffe ciliaire X et le déplacement du moteur d'adaptation x_a en réponse à cette déflexion. Dans l'état stationnaire, $X = 0$ et $x_a = 0$. Dans toute la suite, nous n'utiliserons que le repère lié à l'axe horizontal de mécano-sensibilité de la touffe ciliaire, sur lequel la position du moteur d'adaptation est repéré par la grandeur $X_a = x_a/\gamma$, qui correspond au glissement adaptatif de la relation entre la probabilité d'ouverture P_o et le déplacement X (Figure I-20). Sur cet axe, l'extension du ressort de transduction s'écrit :

$$Y = X + X_r - X_a - DP_o + D/2$$

avec $D = d/\gamma$ et $X_r = x_r/\gamma$. Au faible nombre de Reynolds caractéristiques de la dynamique de la touffe ciliaire, le principe fondamental de la dynamique s'écrit :

$$\lambda \dot{X} = -K_{GS} Y - K_{SP} (X - X_{SP}) + F_{ext} \quad (I.9)$$

où X_{SP} est la position à laquelle se placerait la touffe ciliaire si tous les liens de bout de cil étaient clivés.

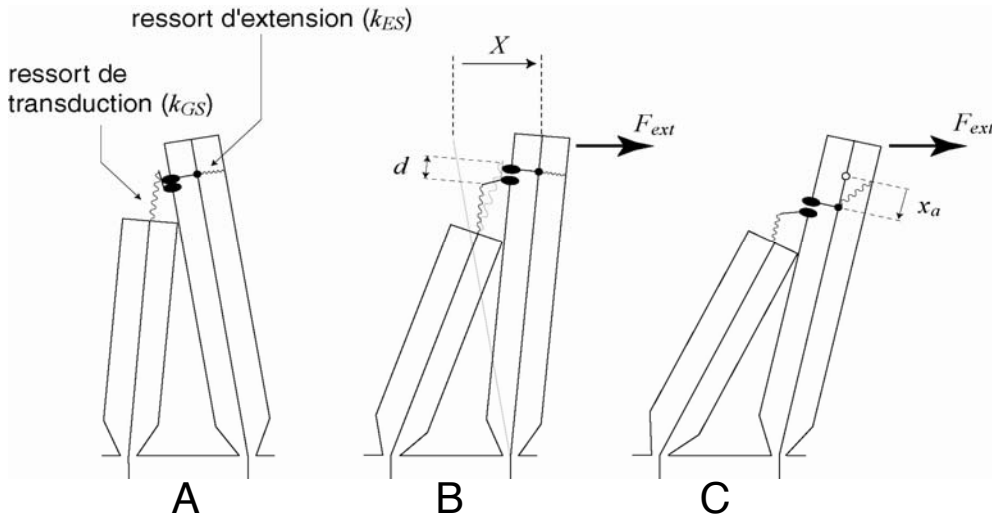


Figure I-20 : Définition de quelques uns des grandeurs du modèle, mises en évidence par une expérience hypothétique. **A.** L'état au repos est supposé être décrit par des canaux tous fermés. **B.** Suite à l'application d'une force F_{ext} positive, tous les canaux s'ouvrent, et cette ouverture diminue l'extension du ressort de transduction de la quantité d . **C.** Lorsque la force extérieure est maintenue, le moteur de l'adaptation glisse vers la racine des stéréocils, ce qui se traduit par un mouvement de ce moteur $x_a > 0$.

Le moteur de l'adaptation est décrit par une caractéristique force/vitesse linéaire. Pour rendre compte du fait que l'adaptation est incomplète, un ressort connecte le complexe de transduction à une position fixe sur le cytosquelette d'actine des stéréocils [Shepherd & Corey, 1994]. La raideur de ce ressort et son extension au repos sont respectivement dénotées dans le repère de stimulation par K_{ES} et X_{ES} . Pour des simulations numériques, X_{ES} sera choisie de telle manière à ce que l'extension du ressort K_{ES} soit nulle lorsque la cellule est dans son état stationnaire. Si l'on reprend l'équation I.4, la relation force/vitesse du moteur d'adaptation s'exprime

$$\lambda_a \dot{X}_a = K_{GS} Y - K_{ES} (X_a - X_{ES}) - F_a \quad (I.10)$$

où F_a est la force d'arrêt de ce moteur. Pour rendre compte de la régulation par le calcium de la cinétique d'adaptation, F_a dépend de la concentration intracellulaire en calcium à proximité du moteur, notée C , d'une manière que l'on supposera

instantanée et au travers d'une relation que l'on approximera comme linéaire. Ainsi, cette force s'écrit

$$F_a = F_{\max} + \left. \frac{dF_a}{dC} \right|_{ref} C$$

avec $\frac{dF_a}{dC} < 0$ (par exemple si le calcium décroche les moteurs des filaments).

$f_{\max} = F_{\max}/\gamma$ est la force maximale que peuvent générer l'ensemble des myosines et est telle que $f_{\max} = N_a f_a$ où N_a est le nombre total de myosines présentes sur tous les complexes de transduction de la touffe ciliaire et f_a la force maximale que chacune d'elle peut générer.

La dynamique de calcium intracellulaire, bien que complexe [Lumpkin & Hudspeth, 1998], sera simplifiée à l'extrême : on suppose que les moteurs sont très proches du pore du canal et que la concentration en calcium en ce point est directement proportionnelle à la probabilité d'ouverture P_o

$$C = C_0 + C_M P_o$$

C_0 est la concentration lorsque tous les canaux sont fermés et $C_0 + C_M$ la concentration lorsqu'ils sont tous ouverts. On considérera dans la suite que la concentration en calcium au niveau du moteur de l'adaptation est proportionnelle à la concentration extracellulaire en calcium, même si en toute rigueur la fraction du courant de transduction portée par le calcium varie avec la concentration extracellulaire en calcium [Lumpkin *et al*, 1997]. De plus, la concentration intracellulaire de calcium est suffisamment faible (~ 100 nM) pour que l'on puisse approximer $C_0 \approx 0$. La force générée par le moteur se réécrit en conséquence

$$F_a = F_{\max} + \left. \frac{dF_a}{dC} \right|_{ref} C_M P_o$$

Pour simplifier l'écriture, on introduit S un paramètre sans dimension caractérisant la rétroaction électro-mécanique du calcium sur les moteurs :

$$S = - \frac{C_M}{F_{\max}} \left. \frac{dF_a}{dC} \right|_{ref}$$

de telle manière à ce que F_a s'écrive

$$F_a = F_{\max} (1 - S P_o) \quad (I.11)$$

Comme S est proportionnel à C_M , la valeur de ce paramètre peut être affectée expérimentalement soit en modifiant la concentration extracellulaire en cet ion, soit en changeant le potentiel intermembranaire de la cellule. Le canal sera supposé n'ayant que deux états, un ouvert l'autre fermé, comme décrit en C.3. Sa probabilité d'ouverture s'écrit

$$P_o = \frac{1}{1 + \exp\left[\left(-\frac{Z(X + X_r - \Delta\mu / Z - X_a)}{k_B T}\right)\right]} \quad (\text{I.12})$$

Les grandeurs X et X_a font références à l'état stationnaire ($X = X_a = 0$ pour l'état stationnaire). Une écriture plus compacte peut être obtenue par un changement d'origine

$$\begin{cases} \bar{X} &= X - X_{SP} \\ \bar{X}_a &= X_a - X_r - D/2 - X_{SP} \end{cases}$$

Avec ces nouvelles variables, l'extension du ressort s'écrit simplement $Y = \bar{X} - \bar{X}_a$, et les équations donnant la dynamique de \bar{X} et \bar{X}_a deviennent

$$\lambda \dot{\bar{X}} = -K_{GS}(\bar{X} - \bar{X}_a - DP_o) - K_{SP}\bar{X} + F_{ext} \quad (\text{I.13})$$

$$\lambda_a \dot{\bar{X}}_a = K_{GS}(\bar{X} - \bar{X}_a - DP_o) - K_{ES}(\bar{X}_a - \bar{X}_{ES}) + F_{\max}(SP_o - 1) \quad (\text{I.14})$$

$$P_o = \frac{1}{1 + A \exp\left(-\frac{\bar{X} - \bar{X}_a}{\delta}\right)} \quad (\text{I.15})$$

avec les notations $\bar{X}_{ES} = X_{ES} + X_r + D/2 + X_{SP}$, $A = \exp\left(\frac{\Delta\mu + \frac{1}{2}K_{GS}D^2/N}{k_B T}\right)$,

et $\delta = \frac{Nk_B T}{K_{GS}D}$ (on a écrit $Z = \gamma k_{GS}d$ sous la forme $Z = K_{GS}D/N$). Les

paramètres K_{GS} , X_r , D , $\Delta\mu$, ... sont fixés et ne dépendent pas de C la concentration intracellulaire instantanée de calcium.

G.2. Trajectoire dans le diagramme F/X

On peut représenter la dynamique de la touffe ciliaire par une trajectoire autour de sa caractéristique force/déplacement. La recherche des points fixes du système d'équations I.13-I.15 donne en général un ou plusieurs états stationnaires ; avec les paramètres utilisés par la suite, il n'en existe qu'un. Dans les mesures des courbes F/X à déplacement imposé, l'état stationnaire correspond à l'origine $X = 0$, $F = 0$ du diagramme. Le choix de l'origine de X_a assure que cette grandeur est également nulle dans l'état stationnaire. La donnée de la courbe F/X permet de prévoir comment la touffe ciliaire va répondre à un échelon de force ou de déplacement abrupt imposé à la cellule.

Chaque mesure d'une courbe F/X est obtenue dans des conditions où le déplacement du moteur de l'adaptation est supposé négligeable sur le temps de la mesure : la mesure est suffisamment rapide pour que le moteur reste figé. Lorsque l'adaptation opère, par exemple lorsque le stimulus est maintenu, la courbe F/X

mesurée dans l'état stationnaire perd sa signification ; une nouvelle mesure de cette courbe donnerait une fonction différente. Dans le cadre du modèle proposé dans le paragraphe précédent, les paramètres K_{GS} , X_r , D , $\Delta\mu$, ... sont fixés. L'équation I.6 utilisée pour décrire la courbe F/X montre que la forme de cette courbe ne change pas lorsque X_a évolue. La dynamique de X_a se traduit par un glissement de la caractéristique force/déplacement que l'on peut calculer. Soit X_0 le déplacement pour lequel la probabilité d'ouverture est de 50 %. L'équation I.2 montre que

$$X_0 = \frac{\Delta\mu}{Z} - X_r + X_a$$

En ce point, la force est donnée par l'équation I.5 :

$$F(X_0) = (K_{GS} + K_{SP}) \left(\frac{\Delta\mu}{Z} - X_r + X_a \right) - N Z / 2 - K_{SP} X_{SP} + K_{GS} (X_r + D/2 - X_a)$$

Avec une modélisation du canal par deux états, la courbe F/X est symétrique par rapport au point $(X_0, F(X_0))$. Lorsque X_a évolue, ce point se déplace selon

$$\begin{aligned} \frac{\partial X_0}{\partial X_a} &= 1 \\ \frac{\partial F(X_0)}{\partial X_a} &= K_{SP} \end{aligned}$$

ce qui indique que la courbe force/déplacement glisse sous l'action de l'adaptation selon une droite dont la pente est donnée par la raideur des pivots K_{SP} .

Lors du mouvement de la touffe ciliaire, les deux variables X et X_a évoluent selon une dynamique complexe. Dans la limite où le mouvement du moteur d'adaptation obéit à une cinétique beaucoup plus lente que celle de la touffe ciliaire, on peut supposer que le point (X, F) qui mesure la position et la force extérieure appliquée à la touffe ciliaire est toujours portée par la caractéristique force/déplacement. Cette caractéristique glisse néanmoins avec X_a au cours du temps. Si l'on fixe les paramètres K_{GS} , K_{SP} , D et N , la forme de cette caractéristique ne change pas lorsqu'elle se déplace. Il est possible de choisir une origine différente afin que les couples (X, F) soient tous portés par la même courbe force/déplacement, et d'avoir une représentation de la dynamique de la touffe ciliaire par sa trajectoire dans le diagramme F/X . En pratique, lorsque le moteur de l'adaptation se déplace d'une quantité δX_a , la courbe F/X se déplace selon l'axe des abscisses d'une même quantité et selon l'axe des ordonnées de $K_{SP} \delta X_a$. Les coordonnées X , X_a , et F sont nulles dans l'état stationnaire, ce qui veut dire que l'origine du diagramme $X=0$, $F=0$ correspond à cet état. Connaissant la position du moteur X_a et la position de la touffe ciliaire X à un instant donné, on peut calculer la force extérieure grâce à l'équation I.13 :

$$F = F_{ext} = K_{GS} (\bar{X} - \bar{X}_a - D P_o) + K_{SP} \bar{X} + \lambda \dot{\bar{X}} \quad (I.16)$$

Le couple (X, F) obtenu à un instant est alors reporté dans le repère force/déplacement, en lui soustrayant le vecteur $(X_a, K_{SP} X_a)$. Dans ce graphe, la coordonnée d'abscisse est donc égale à $X - X_a$ et l'ordonnée vaut $F - K_{SP} X_a$. Lorsque l'on néglige la friction ($\lambda \rightarrow 0$), l'équation I.16 donne exactement la courbe force/déplacement de la touffe ciliaire. Dans cette limite, les points de fonctionnement seront donc portés par cette caractéristique. En reprenant les résultats donnés dans la partie F, nous présentons ci-dessous (Figure I-21) une illustration numérique de ce graphe dans le cas où la touffe ciliaire oscille.

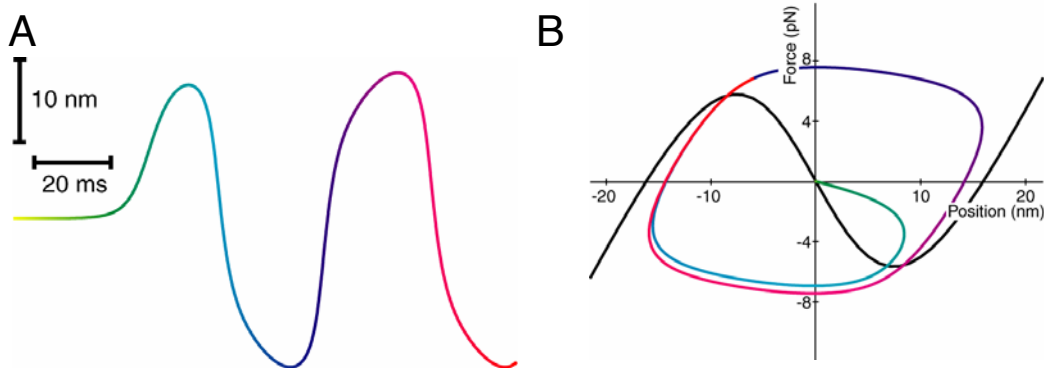


Figure I-21 : Trajectoire d'une touffe ciliaire oscillante dans son diagramme force/déplacement. **A.** Simulation numérique de deux cycles d'oscillations d'une cellule dont les paramètres sont donnés dans l'annexe G page 229, colonne A. **B.** Trajectoire dans le diagramme F/X correspondante. Comme on n'a pas négligé la friction, cette trajectoire s'écarte sensiblement de la courbe F/X . L'origine du graphe a été choisie comme étant le point de fonctionnement au repos.

Nous dénommerons par trajectoire dans le diagramme force/déplacement le lieu des points $(X - X_a, F - K_{SP} X_a)$. Si la cinétique du moteur de l'adaptation est beaucoup plus lente que celle de la touffe ciliaire, ils sont tous portés par la caractéristique F/X de la touffe ciliaire. En réalité, la caractéristique F/X est une courbe statique, qui ne tient pas compte du terme de force dû à la friction sur la touffe ciliaire, sous l'action duquel le point de fonctionnement peut quitter la courbe F/X . Le point de fonctionnement au repos est toujours porté par la caractéristique F/X et est donné en toute rigueur par la recherche de l'état stationnaire du système d'équation I.13 et I.14 : ce point est l'origine du diagramme.

II. METHODES

A. Modèle expérimental

A.1. Animaux modèles

Nous avons réalisé la plupart de nos expériences sur la grenouille taureau (*Rana catesbeiana*¹). Ses organes acoustico-vestibulaires sont facilement accessibles et on prouvé depuis une trentaine d'années leur robustesse vis-à-vis de l'expérimentation *in vitro*. Les individus ont une taille (mesurée de tête à croupe) de 8 à 30 cm, et peuvent peser jusqu'à 1 kg. On la trouve nativement en Amérique du Nord, mais elle a été introduite (accidentellement ou volontairement) en Amérique du Sud en Asie et en Europe (à proximité de Bordeaux, où elles sont déclarées nuisibles).

¹ Rang taxonomique : Vertébrés - Amphibiens - Anura – Ranidae.

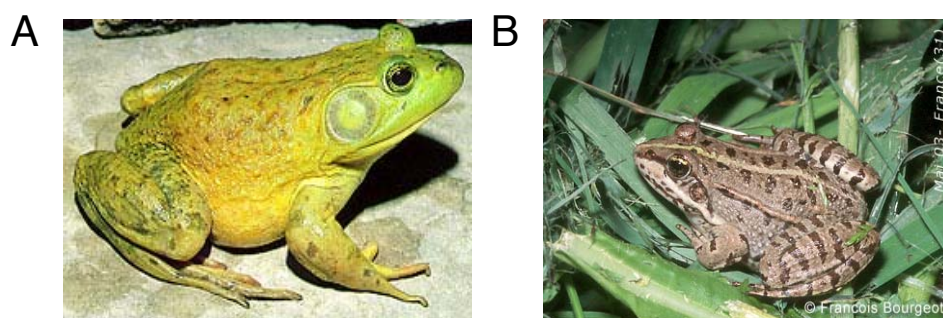


Figure II-1 : **A.** *Rana catesbeiana*. **B.** *Rana esculenta*.

Quelques expériences ont également été réalisées avec succès sur une grenouille (*Rana esculenta*) appartenant à la même famille et très commune en Europe (très appréciée dans les restaurants français : *esculenta* signifie comestible). Ce n'est pas une espèce à proprement parler², mais un hybride fertile des espèces *Rana ridibunda* et *Rana lessonae*³. Elle est de taille plus modeste, entre 7 et 9 cm pour une cinquantaine de grammes en moyenne. C'est une espèce protégée en Europe⁴ ; il était néanmoins possible de s'en fournir pour l'expérimentation auprès de centres d'élevages jusqu'en Septembre 2004. Par la suite, une directive du Ministère de l'Agriculture est venue durcir les conditions de leur obtention, et nous avons alors abandonné ce modèle.

Il faut au têtard de grenouille taureau nouveau-né trois ans pour atteindre le stade adulte, et deux années supplémentaires pour qu'il devienne sexuellement mature. Cette durée, ainsi que le coût et la difficulté de mettre en place un élevage, nous ont amené à importer ces grenouilles et à les maintenir en captivité jusqu'au moment de l'expérience. L'Institut Curie possède en son sein une animalerie Xénope, dans laquelle un espace nous a été attribué. Nous l'avons adapté pour pouvoir accueillir des *Rana*.

A.2. Préparation des organes

A.2.1. Le saccule des *Rana*

Le saccule de la grenouille est un organe de l'oreille interne sensible aux accélérations verticales de la tête par exemple produite par les vibrations du sol.

²

Il serait plus juste de parler de klepton.

³

On la trouve parfois sous le nom taxonomique *Rana kl. esculenta* ou sous le nom commun grenouille verte de Linné.

⁴

L'introduction de *Rana catesbeiana* s'est fait aux dépens des autres espèces ; leur habitat et alimentation sont compatibles et les grenouilles taureau sont suffisamment voraces et grosses pour pouvoir manger les autres grenouilles.

Chez les *Rana*, il se compose d'un épithélium plan d'environ 3000 cellules ciliées reposant sur une plaque cartilagineuse (Figure II-2.B). Les touffes ciliaires des cellules sont couplées entre elles par la membrane otolithique, elle même liée au sac otoconial qui est rempli de cristaux de carbonates de calcium (Figure II-2.A).

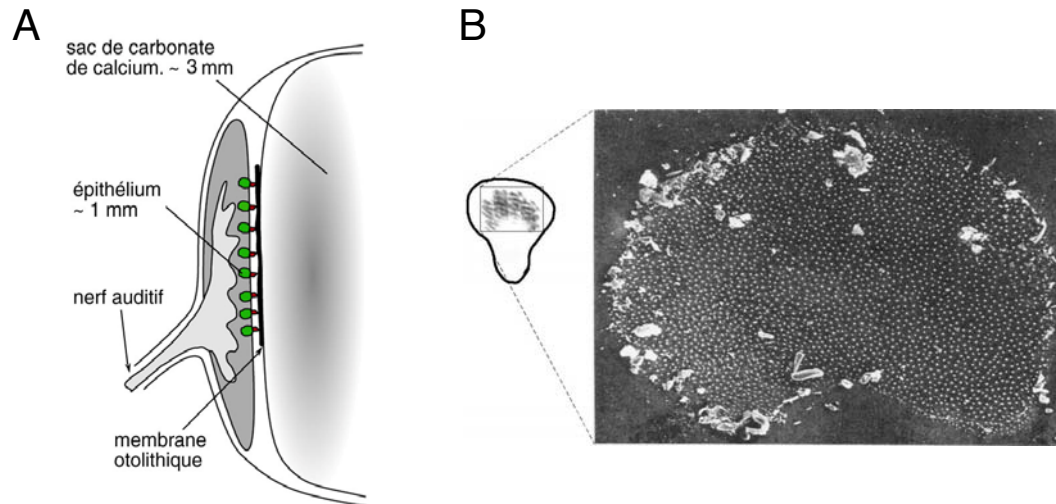


Figure II-2 : **A.** Schéma du saccule de grenouille. **B.** Épithélium sensoriel du saccule de grenouille taureau vu en microscopie électronique [Jacobs & Hudspeth, 1990]. Plus grande largeur : 500 μm . Chaque point blanc est une touffe ciliaire, les amas clairs sont des cristaux de carbonate de calcium.

L'épithélium est couplé au crâne par le nerf qui lui est relié, alors que le sac est libre de bouger dans la capsule otique. Une accélération verticale de la tête de l'animal, par exemple provoquée par des vibrations du sol, induit un mouvement inertiel du sac otoconial par rapport au crâne et donc un cisaillement de la membrane otolithique par rapport à la surface apicale de l'épithélium sensoriel. Ce cisaillement provoque une déflexion des touffes ciliaires, initiant la transduction mécano-électrique. Le saccule peut détecter des accélérations de $\sim 1 \mu\text{g}$, où g est le champ de gravitation terrestre [Yu *et al*, 1991]. La taille importante du saccule (environ 2-3 mm pour l'ensemble sac+épithélium) et la rigidité de la plaque cartilagineuse font de lui un organe de choix vis à vis de la microdissection. Le fait que l'épithélium soit plan facilite grandement l'observation sous microscope et la reconstitution de son environnement ionique. Nous avons utilisé cet organe presque exclusivement. Il présente toutefois certaines limitations : vu la fonction du saccule, les cellules ciliées ne répondent qu'aux basses fréquences (entre 10 et 100 Hz) et ne sont pas distribuées spatialement, contrairement aux cellules auditives, en fonction de leurs fréquences caractéristiques. L'étude du saccule ne permet donc d'aborder l'aspect fréquentiel que d'une façon limitée.

A.2.2. Extraction et préparation

La grenouille est sacrifiée juste au début de l'expérience, par décérébration suivie d'une démyélation, puis elle est décapitée, et le reste de l'extraction se fait sur la partie supérieure du crâne, maintenue humide par de la périlymphe oxygénée à température ambiante (21 – 24 °C). Les oreilles internes sont situées dans deux capsules otiques, situées sous le palais de part et d'autre de la colonne vertébrale. Celles-ci sont ouvertes, le nerf auditif est sectionné et les canaux semi-circulaires coupés avant que l'oreille interne ne soit extraite et plongée dans la périlymphe oxygénée. Les micromanipulations qui suivent se font sous loupe binoculaire (*Leica MZ7*) avec des pinces et ciseaux à microdissection (*Fine Science Tools*). Le saccule est extrait du labyrinthe et le sac de carbonate de calcium finalement enlevé pour ne conserver que l'épithélium sensoriel sur sa plaque cartilagineuse, d'un diamètre d'environ 1 mm.

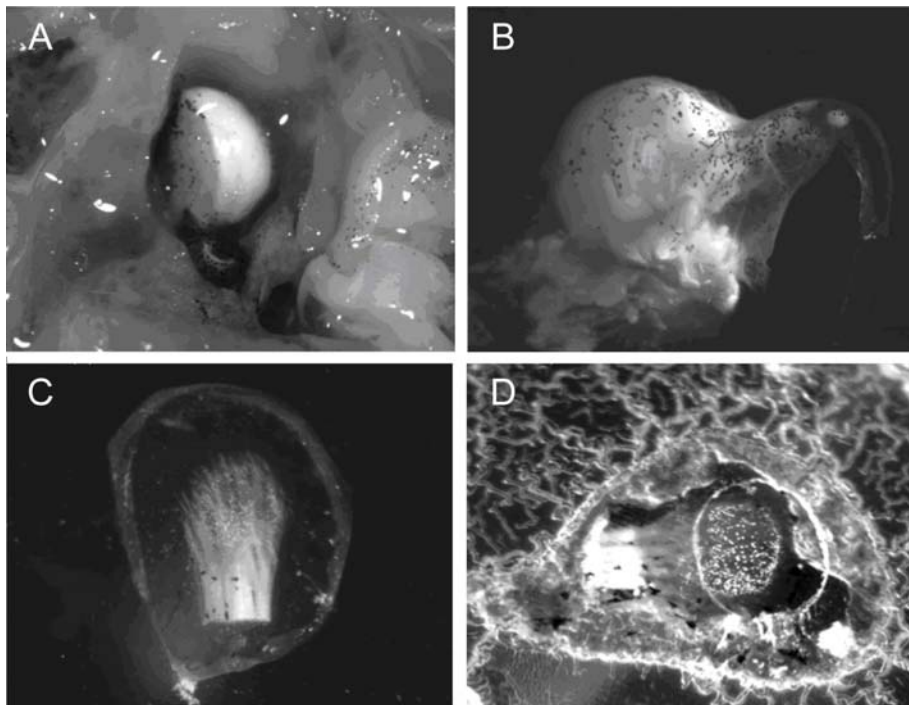


Figure II-3 : Dissection du saccule de la grenouille taureau. **A.** Saccule au milieu de la capsule otique. On distingue (à sa gauche) le nerf qui vient innervier l'épithélium sensoriel et le sac otoconial (blanc). **B.** Oreille interne après extraction de la capsule otique. **C.** Le saccule. On distingue l'épithélium sensoriel en forme de haricot au centre et une partie du nerf qui vient innervier les cellules ciliées. **D.** Le saccule est collé sur un disque percé d'un trou au travers duquel on distingue la membrane otolithique. Les points blancs qu'on aperçoit sont des cristaux de carbonate de calcium enchâssés dans cette membrane.

Le saccule est alors collée par un adhésif cyanoacrylate biocompatible (*Tissu glu – Ellman international Inc.*) sur un disque percé d'un trou d'environ 1 mm de diamètre, découpé dans un film transparent de 50 μm d'épaisseur. Comme tous les accès aux cellules ciliées se feront au travers de cet orifice, il faut que son diamètre soit suffisamment grand ; on y amènera dans certains cas une fibre de verre et une micropipette à iontophorèse, qui devront passer sous l'objectif et dans le trou pour atteindre la cellule d'intérêt. Ce problème d'encombrement stérique montre un des avantages du saccule de *Rana catesbeiana* sur celui de *Rana esculenta* : dans le dernier cas, l'épithélium est suffisamment petit en diamètre pour que le contact entre la fibre et les rebords du trou vienne limiter le nombre de cellules ciliées accessibles. Une solution est d'utiliser pour le disque une feuille aussi fine que possible tout en restant suffisamment rigide et de biseauter les bords de l'orifice.

L'épithélium est ensuite placé dans une chambre à deux compartiments qui permet de baigner la partie basale des cellules dans de la périlymphe oxygénée et leur extrémité apicale dans le liquide d'intérêt (endolymphe en général, voir le paragraphe A.3). Afin de pouvoir accéder aux touffes ciliaires, les liens entre la membrane otolithique et les touffes ciliaires sont digérés pendant 20 à 30 mn par une protéase, la subtilisine (*protéase n° XXIV ou VIII – Sigma*), à une concentration de 50 à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans de l'endolymphe. Ce traitement permet de retirer la membrane otolithique en minimisant les dommages mécaniques infligés aux cellules ciliées.

La qualité d'une préparation est jaugée d'abord par une mesure de courant de transduction transépithélial de l'ensemble des cellules ciliées stimulées en masse (voir la section A.4) en périlymphe ($[\text{Ca}^{2+}] = 4\text{mM}$) : toute préparation dont le courant de transduction transépithélial est inférieur à 80 nA est rejetée. On juge également l'aspect général de la préparation sous microscope. Pour une bonne préparation, la surface de l'épithélium apparaît lisse, les corps cellulaires sont bien définis, et les touffes ciliaires doivent être intègres. Au cours de l'expérience, l'état général de la préparation se dégrade, ce qui se manifeste par la négation des caractéristiques sus-citées et l'apparition de blebs et de débris organiques polluant le milieu, signes de mort cellulaire. Dans la plupart des cas décrits ici, la qualité d'une préparation parvient à se maintenir à un niveau acceptable sur une durée comprise entre 3 et 7 heures après la mort de l'animal.

A.3. Milieux ioniques et conditions expérimentales

Grâce à l'utilisation d'une chambre expérimentale à deux compartiments hermétiques (Figure II-4), les cellules ciliées peuvent baigner dans deux milieux ioniques différents, mimant ainsi les conditions rencontrées *in vivo*, et dont la composition est donnée dans le tableau II-1. Les corps cellulaires sont immergés

dans un milieu salin extracellulaire standard, la périlymphe. Ce milieu est riche en Na^+ et présente une concentration en calcium d'environ 4 mM. Une fois extraite de l'animal, le saccule est privé de l'oxygénation par les voies sanguines ; l'oxygénation du milieu permet de compenser ce manque d'oxygénation. La périlymphe artificielle que nous avons utilisée contient de la créatine et du pyruvate de sodium qui sont des composés intermédiaires dans la voie de synthèse anaérobie alactique de l'ATP ; ces composés allongent la durée de vie de la préparation.

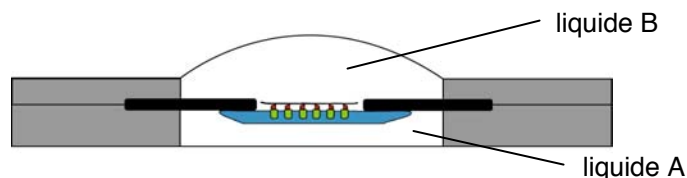


Figure II-4 : Schéma de la cellule à deux compartiments utilisée.

La surface apicale des cellules ciliées, de laquelle émergent les touffes ciliaires, baigne dans l'endolymphe. Deux types d'endolymphe artificielle ont été utilisés. La première est une endolymphe standard où le cation majoritaire est le potassium, comme pour le milieu trouvé *in vivo*, et de concentration en calcium $\sim 250 \mu\text{M}$. Une étanchéité imparfaite entre les deux compartiments peut amener certains des ions K^+ à passer du compartiment apical dans le compartiment basal, rempli de périlymphe qui est un milieu pauvre en cet ion. Cet afflux peut dépolariser les cellules ciliées, ce qui conduit à une détérioration rapide de leur état. Pour s'affranchir de ce problème potentiel, nous utilisons chaque fois que c'est possible une endolymphe modifiée, où le potassium a été remplacé par NMDG⁵. Ce gros cation ne traverse pas le pore du canal et n'interfère pas avec l'entrée des autres ions [Lumpkin *et al*, 1997]. L'endolymphe-NMDG a une viscosité mesurée très proche de celle de l'eau, comme celles de la périlymphe et de l'endolymphe standard, mais un indice optique plus élevé (1,337 contre 1,333 pour l'eau distillée et 1,334 pour la périlymphe) ce qui vient légèrement affecter la netteté des images.

⁵

N-méthyl-D-glucamine.

Composé	Pérlimpe	Endolympe	Endolympe-NMDG
Na ⁺	110 mM	2 mM	2 mM
K ⁺	2 mM	118 mM	3 mM
Cl ⁻	~120 mM	~120 mM	~120 mM
Ca ²⁺	4 mM	250 µM	250 µM
NMDG			110 mM
HEPES	5 mM	5 mM	5 mM
D(+)-glucose	3 mM	3 mM	3 mM
créatine phosphate	2 mM		
pyruvate de sodium	2 mM		
pH	7,3 – 7,5	7,3 – 7,5	7,3 – 7,5
Force osmotique	~230 mOsmol.kg ⁻¹	~230 mOsmol.kg ⁻¹	~230 mOsmol.kg ⁻¹

Tableau II-1 : Composition des différents milieux ioniques utilisés

Nous avons fait le choix de nous placer dans des conditions qui soient les plus proches possibles de celles rencontrées *in vivo*. Toutes les mesures sont faites dans une situation où les cellules ciliées demeurent dans l'épithélium sensoriel du saccule, lui même placé dans un environnement ionique similaire à celui qu'il rencontre dans l'oreille interne de l'animal. En particulier, la surface apicale des cellules ciliées n'est exposée à un milieu fort Ca²⁺ (~4 mM) que pendant la durée de la dissection (de 15 à 45 mn). Des mesures mécaniques sur cellules isolées [Cheung & Corey, 2005] facilitent l'accès aux touffes ciliaires et permettent l'enregistrement simultané du courant de transduction. Il est néanmoins beaucoup plus difficile de maintenir l'intégrité mécanique des complexes de transduction, comme l'indiquent les faibles raideurs mesurées dans ces conditions. De plus, ce procédé ne permet pas l'immersion dans deux milieux distincts endolympe/pérlimpe.

Les conditions *ex vivo* dans lesquelles nous travaillons n'ont pas ces problèmes, mais la contrepartie est qu'il nous est difficile d'accéder à la paroi basolatérale des cellules ciliées pour réaliser des expériences de « patch clamp » et mesurer le courant de transduction. Il est également difficile de former un lien adéquat entre une micropipette et la surface apicale des cellules ciliées (la plaque cuticulaire contient un cortex dense d'actine qui lui donne une grande rigidité, et l'adhésion d'une micropipette sur une membrane se fait mal quand la concentration de calcium est faible, comme c'est le cas pour l'endolympe). Ce travail de thèse n'intègre donc aucune mesure de courant de transduction sur cellule unique.

A.4. Mesure des courants transépithéliaux

Afin d'avoir un moyen de caractériser l'état de nos préparations, nous avons reproduit un dispositif [Corey & Hudspeth, 1983b] permettant de stimuler en masse les cellules ciliées de l'épithélium sensoriel du saccule et de mesurer le courant de transduction transépithélial.

A.4.1. Protocole

Le saccule est extrait de l'oreille interne de la grenouille (voir la section A.2.2), mais la membrane otolithique n'est pas digérée par une protéase ni pelée. Une fois collé sur un disque, l'épithélium est placé dans une chambre à deux compartiments munie de quatre électrodes Ag/AgCl. Pour ces tests, les cellules ciliées baignent entièrement dans de la périlymphe standard (Tableau II-1).

La stimulation des touffes ciliaires se fait en déplaçant la membrane otolithique par un barreau de verre dont le mouvement est imposé par un stimulateur piézoélectrique. Une excursion sinusoïdale à une fréquence de 70 Hz (proche de la fréquence de sensibilité maximale pour cet organe) et une amplitude de $\pm 1 \mu\text{m}$ suffit à saturer la transduction mécano-électrique. Le diamètre de la tige est de l'ordre de la moitié de la taille d'un épithélium ($500 \mu\text{m}$ environ). Afin qu'il y ait un bon couplage entre la membrane otolithique et la tige, celle-ci est sectionnée à angle droit et rendue rugueuse au papier de verre si nécessaire.

Deux paires d'électrodes, baignant chacune respectivement dans le compartiment supérieur et inférieur, sont branchée sur un circuit électronique qui impose une tension transépithéliale nulle et mesure le courant nécessaire pour maintenir cette tension égale à zéro. Ce courant est alors converti en tension avec un gain courant/tension ajustable de 10^7 - 10^8 V.A^{-1} , avant d'être digitalisé et enregistré. L'appareillage utilisé permet de détecter des variations de courant de 100 pA, ce qui est suffisant pour l'usage que nous en faisons.

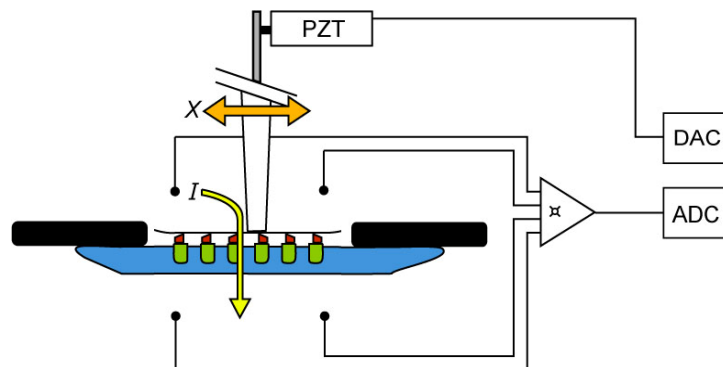


Figure II-5 : Stimulation et mesure du courant transépithélial. Une paire d'électrode Ag/AgCl impose une différence de potentiel nulle entre les deux compartiments alors qu'une autre paire compense et mesure le courant de transduction transépithélial qui résulte d'un mouvement de la membrane otolithique selon l'axe moyen de mécano-sensibilité des cellules ciliées. Voir également l'annexe E pour le détail des circuits électroniques.

A.4.2. Mesures

L'amplitude du courant transépithélial permet d'estimer le nombre de complexe de transduction qui sont fonctionnels et donc la qualité de nos dissections. Si l'on suppose qu'un saccule possède 3000 cellules ciliées, que chacune d'elles porte 50 canaux dont la conductivité est 100 pS, la conductance totale due aux canaux de transduction est $g_{tot} = 3000 \times 50 \times 100 \text{ pS} = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ S}$. Lors d'une stimulation saturante, la conductivité de l'épithélium voit sa valeur augmenter de $\sim g_{tot}/2$, car une moitié des cellules seulement est stimulée dans sa direction excitatrice (l'autre moitié est orientée à l'opposé, et est stimulé dans la direction inhibitrice). L'amplitude maximale des variations de courants que l'on peut obtenir est $I_{max} = \frac{1}{2} g_{tot} \times |V| = 450 \text{ nA}$, si l'on suppose que le potentiel transmembranaire des cellules est -60 mV. Un courant de 100 nA correspond à ~ 330 cellules intactes.

Le processus d'extraction et de dissection est très traumatisant pour les cellules, et celles-ci n'exhibent de propriétés mécaniques actives que si l'on trouve suffisamment de complexes de transduction fonctionnels. Le courant transépithélial le plus élevé que nous sommes parvenus à obtenir était de 400 nA⁶; toute préparation dont le courant de transduction transépithélial était inférieur à 80 nA a été rejetée.

⁶ Record détenu par Pascal Martin.

B. Dispositif pour la stimulation d'une cellule unique dans l'épithélium sensoriel

B.1. Aperçu général

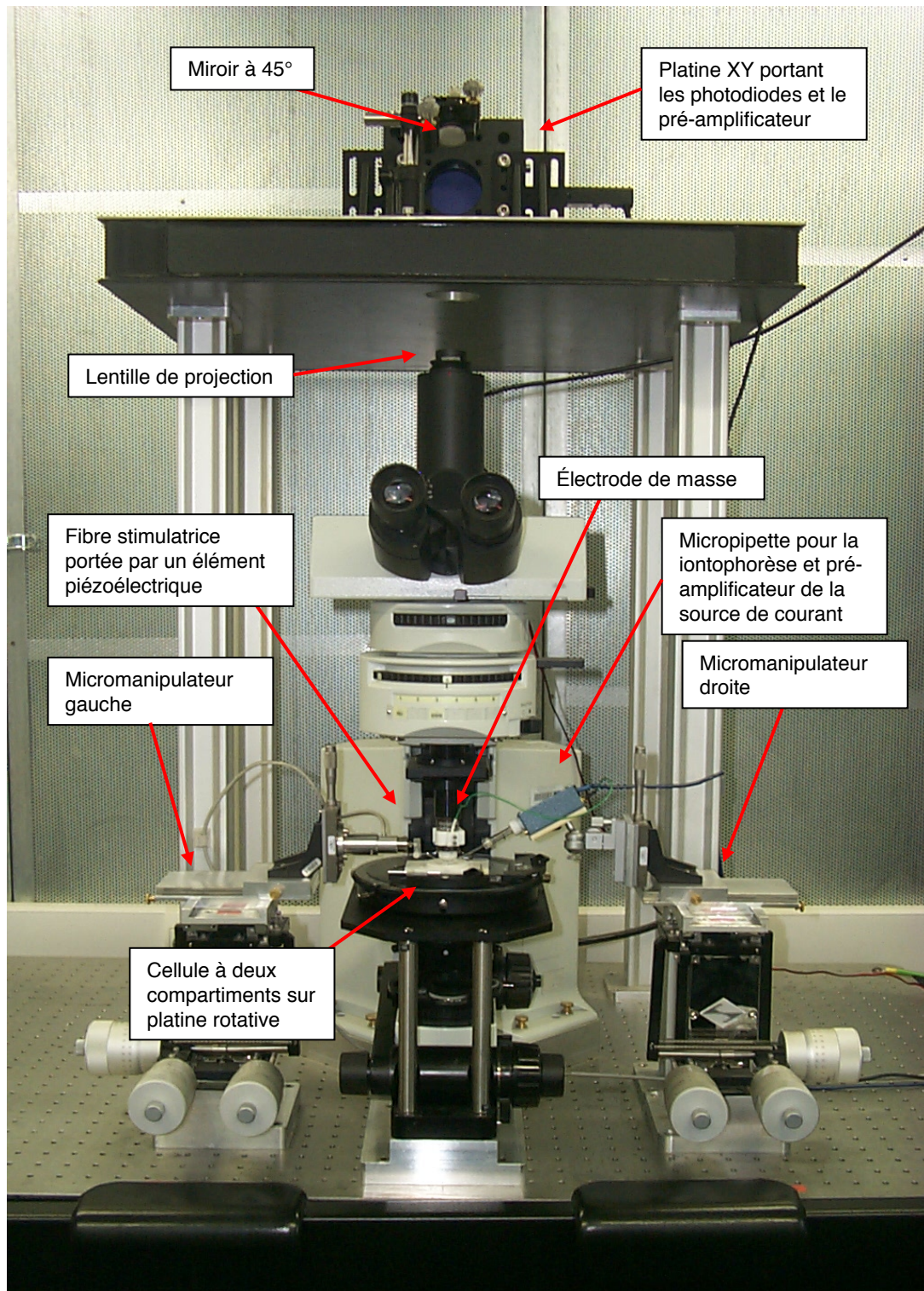


Figure II-6 : Vue d'ensemble de l'appareillage expérimental.

On donne ici une brève description de l'appareillage expérimental que nous avons mis en œuvre au laboratoire Physico-Chimie du Vivant de l'Institut Curie ; ses différentes parties seront détaillées dans les paragraphes suivants. Le montage s'articule autour d'un microscope droit permettant un large accès à la préparation. La platine du microscope permet de déplacer l'échantillon dans un plan XY horizontal et, pour une position donnée, de le pivoter pour orienter les touffes ciliaires selon l'axe de stimulation sans perdre le centrage. Dans notre configuration, l'épithélium sensoriel est placé dans une cellule à deux compartiments qui permet de baigner les cellules ciliées dans deux milieux ioniques différents ; les touffes ciliaires plongent dans le compartiment du haut, placé sous l'objectif et laissé ouvert. Elles sont accessibles à la stimulation au travers de l'orifice du disque sur lequel est collé l'épithélium (voir partie A.2). La préparation est éclairée par une source lumineuse intense fournie par une lampe à vapeur de mercure, et l'image de la préparation donnée par l'objectif du microscope peut être soit formée sur une caméra CCD, dans les oculaires du microscope, ou projetée sur un système photométrique (photodiodes) permettant la mesure précise et rapide de la position de la touffe ciliaire (voir B.3).

Le dispositif est fixé sur une table optique (*Technical Manufacturing Corporation*) montée sur vérins pneumatiques et l'ensemble de l'appareillage est placé dans un caisson de 12 m³ offrant une isolation phonique de 30 dB en moyenne (*SERAC*). Le système photométrique est fixé sur une autre table optique placée au dessus du microscope.

Deux micromanipulateurs placés à gauche et à droite de la platine du microscope, portent les instruments permettant respectivement la micromanipulation des touffes ciliaires et la modification de leur environnement ionique. Le micromanipulateur de gauche porte une fibre de verre qui permet de stimuler mécaniquement la touffe ciliaire (voir B.2). Brièvement : chaque fibre de verre est un capillaire étiré finement à angle droit pour former une tige souple. L'extrémité de la fibre est accolée à la touffe ciliaire alors que la base de cette fibre est solidaire d'un élément piézoélectrique : le déplacement de sa base crée une déflexion de la fibre et génère une force.

Le micromanipulateur de droite utilise un montage identique, mais porte les micropipettes permettant la modification de l'environnement ionique de la cellule par iontophorèse. Celles-ci sont fabriquées à partir de capillaires étirés et remplies d'une solution ionique. En faisant passer un courant électrique au travers de ces micropipettes amenées à proximité de la cellule, on peut éjecter des ions de la solution qu'elles contiennent (voir B.5).

B.2. Stimulation mécanique d'une touffe ciliaire

Pour stimuler mécaniquement une touffe ciliaire, nous avons utilisé des microfibres de verre flexibles dont l'extrémité est accolée au bulbe kinociliaire [Crawford & Fettiplace, 1985 ; Howard & Hudspeth, 1987]. La connaissance du déplacement Δ imposé à la base et du déplacement X mesuré à l'extrémité de la fibre permet d'accéder à la force élastique appliquée à la touffe ciliaire en utilisant la loi de Hooke $F = K_F(\Delta - X)$, où K_F est la raideur de la fibre (Figure II-7).



Figure II-7 : Représentation schématique (vue de dessus) de la stimulation d'une touffe ciliaire (en rouge) par manipulation de la base d'une fibre de verre dont l'extrémité libre est couplée au bulbe kinociliaire.

B.2.1. Fabrication des fibres

Un capillaire en borosilicate (*R-series* – *World Precision Instrument*) est d'abord allongé par une étireuse (*Model P-97* – *Sutter Instrument Co.*) pour réduire son diamètre de 1,2 mm à quelques microns sur une distance de l'ordre de 1 cm. Il est ensuite courbé à la flamme d'environ 30° autour d'un point situé à environ 2 cm de leur extrémité, afin de permettre son positionnement sous l'objectif. Ceci fait, son extrémité est étirée au moyen d'une forge manuelle à 90° de l'axe du capillaire, pour former la fibre proprement dite. Pour cette étape cruciale, le capillaire est fixé perpendiculairement à un axe mobile en fer doux placé dans l'entrefer d'un électroaimant. En utilisant un micromanipulateur et une loupe binoculaire, la pointe du capillaire est mise au contact d'une petite boule de verre en fusion qui se trouve sur un fil de platine (diamètre 250 μm) dans lequel on fait circuler un courant de ~ 6 A afin de le chauffer à blanc. Le pont de verre qui relie la petite boule au capillaire s'affine et l'électroaimant est mis en action juste avant que ce pont ne rompe : le champ magnétique créé met en mouvement l'axe de fer doux, ce qui étire le pont et forme une fibre. Avec de l'expérience, on obtient des fibres dont la longueur est dans la gamme 100-500 μm avec un diamètre compris entre 500 nm et 1 μm et dont

on sait à l'avance que la raideur finale sera dans la bonne gamme. Ceci fait, elles sont recouvertes d'une couche d'un alliage or-palladium de 10 à 20 nm d'épaisseur à l'aide d'un sputter/coater (*Hummer 6.1 – Anatech ltd.*) fonctionnant à faible intensité (si celle-ci est trop forte, l'échauffement qui s'ensuit détruit la plupart des fibres).

Une fibre est rarement utilisée au-delà de la semaine qui suit sa fabrication. Après un temps trop long, nous avons en effet noté que les fibres perdaient leur pouvoir adhésif, et ce même si elles restaient inutilisées. Il est probable qu'au cours du temps la couche métallique se couvre de poussières et d'impuretés (que ce soit dans le fluide qui baigne le tissu ou dans la jarre de stockage). En dernier recourt, s'il n'est pas possible d'obtenir un bon couplage, nous faisons appel à une colle d'origine protéique : la concanaviline A (*Sigma-Aldrich*). L'extrémité de la fibre est alors immergée dans une solution contenant cette protéine à 1 mg/mL pendant quelques secondes avant d'être utilisée, établissant ainsi un bon contact. Ce palliatif n'est utilisé que rarement.

B.2.2. Calibration des fibres

Plongée dans le fluide d'intérêt (endolymph ou périlymphe), une fibre fluctue librement sous l'effet de l'agitation thermique. Une fois les déplacements de la fibre calibrés, la mesure du spectre de ce mouvement Brownien permet d'accéder à la raideur K_F et au coefficient de frottement visqueux ξ_F mesurés à l'extrémité de la fibre (voir l'annexe B). Une fibre plongée dans un fluide visqueux se comporte comme un filtre passe bas du premier ordre dont la fréquence caractéristique $\xi_F / (2\pi K_F)$ est dans la gamme 200-800 Hz : aux basses fréquences, la réponse de la fibre est indépendante de la fréquence mais son mouvement est sur-amorti aux hautes fréquences (Figure II-8). Les fibres dont la raideur est en dehors de l'intervalle 0,1-0,6 pN/nm sont éliminées : les fibres plus souples demanderaient une excursion du stimulateur trop importante pour défléchir une touffe ciliaire de manière significative. Celles qui sont trop rigides sont insuffisamment défléchies par une touffe ciliaire pour que l'on ait une bonne précision sur la force générée. Le spectre des fibres rigides permet de mettre en évidence des vibrations mécaniques parasites (Figure II-8), notamment à 89 Hz. Pour une raideur donnée, on cherche à obtenir le coefficient de frottement le plus faible possible ; là encore on élimine celles (trop longues) pour lequel ce coefficient est trop important. Une « bonne » fibre aura une raideur $K_F \sim 0,2$ pN/nm et un coefficient de frottement $\xi_F \sim 4.10^{-5}$ pN.s/nm. Cette technique de calibration permet de calibrer rapidement et simplement une fibre alors qu'un épithélium est présent sous l'objectif.

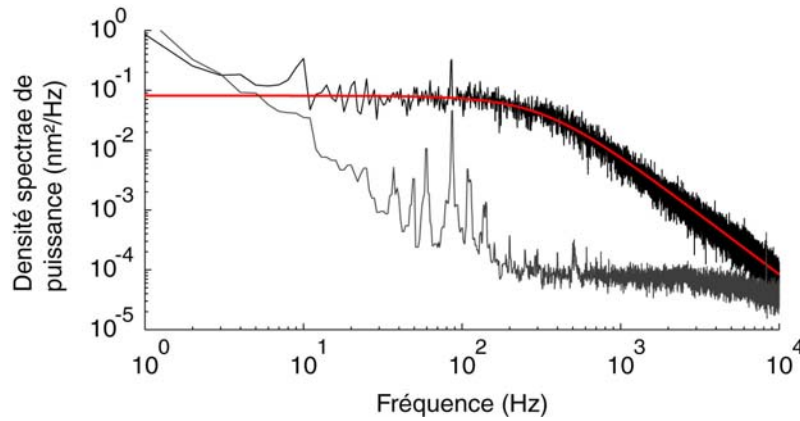


Figure II-8 : Spectre des fluctuations de l'extrémité d'une fibre souple, de raideur $K_F = 0,176 \text{ pN/nm}$ et de friction $\xi_F = 5,7 \cdot 10^{-5} \text{ pN.s/nm}$. Courbe noire : spectre des mouvements de l'extrémité de la fibre. Courbe grise : spectre des mouvements de sa base. Courbe rouge : ajustement du spectre de la fibre par une fonction lorentzienne (voir l'annexe B).

B.2.3. Manipulation des fibres

La base de la fibre est montée sur un stimulateur piézoélectrique (*PA 8/14*, *Piezosystem Jena*) branché sur un générateur de tension à bas bruit (*ENT150/20-ENV150*, *Piezosystem Jena*). Ce système permet d'imposer des déplacements avec une résolution (théorique) sub-nanométrique dans la gamme 1 nm - $8 \text{ }\mu\text{m}$ le long d'un axe horizontal, et est utilisé pour la stimulation des touffes ciliaires. Afin de manipuler la fibre sous l'objectif, le stimulateur est lui-même monté sur une platine micrométrique (*M-UMR 5.16 – Newport*) permettant de le positionner verticalement et l'ensemble est fixé sur une platine coulissante XY à queue d'arondes qui est utilisée pour positionner manuellement fibre au dessus de la préparation. Pour obtenir la finesse nécessaire au couplage d'une fibre à une touffe ciliaire, l'ensemble est monté sur un micromanipulateur permettant un positionnement à l'échelle micrométrique (*MP85 – Sutter Instrument*).

L'extrémité flexible de la fibre est accolée au bulbe kinociliaire de la cellule que l'on souhaite étudier. C'est donc par l'entremise du kinocil que les stimuli mécaniques sont transmis au reste de la touffe ciliaire. Le choix du bulbe comme point d'application de la force extérieure est motivé par plusieurs considérations : C'est d'abord le lieu d'application des stimuli *in vivo*. D'autre part, sa surface est telle qu'une fibre fraîchement fabriquée adhère naturellement à son contact. Enfin, ce point d'application est situé à une hauteur $6.7 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{m}$ de la surface apicale de la cellule qui varie très peu d'une cellule à une autre [Jacobs & Hudspeth, 1990]. Comme la raideur apparente d'une touffe ciliaire dépend de la hauteur à laquelle on applique le stimulus, il est important de stimuler les cellules au même endroit si on veut pouvoir en comparer les propriétés mécaniques.

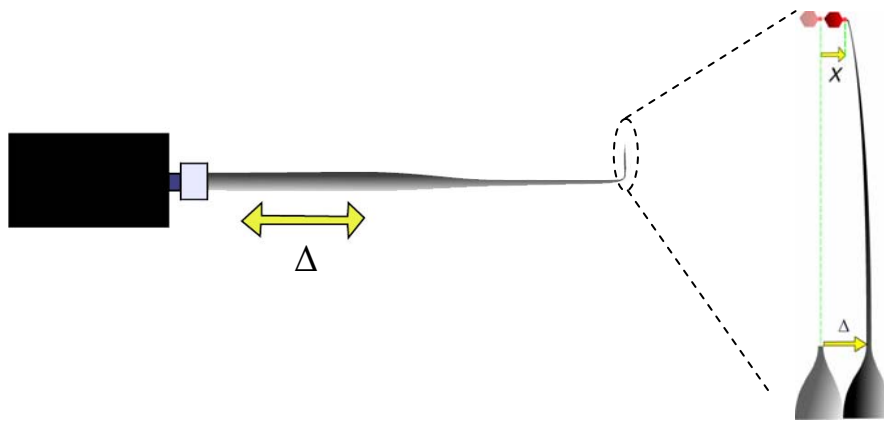


Figure II-9 : Manipulation d'une fibre souple.

B.2.4. Stimulation mécanique par déplacement de la base de la fibre

Une fibre est couplée en son extrémité à une touffe ciliaire, et la stimulation se fait en imposant des marches de déplacements à la base de la fibre. Comme la raideur de la fibre mesurée à son extrémité est de 0.2 à 1 fois celle de la touffe ciliaire, on ne travaille ni à déplacement imposé, ni à force imposée. Tous les signaux (mesures et signaux de commandes) sont filtrés sauf mention contraire par un filtre passe-bas de Bessel à 8 pôles avec une fréquence de coupure à 3 dB de 1 kHz. Sur la figure II-10.A est tracée en exemple la réponse d'une touffe ciliaire couplée à une fibre souple à une marche de déplacement de sa base. Le mouvement X obtenu est d'amplitude d'autant plus faible que la raideur de la touffe ciliaire est grande, et la mesure de la déflexion $\Delta-X$ obtenue permet de calculer cette raideur. Les temps de montée sont imposés par le stimulateur piézoélectrique et sont de l'ordre de la milliseconde. La cinétique d'activation du déplacement de la fibre en réponse à une marche de commande est sigmoïdale : la position de la fibre atteint 5% de l'amplitude totale après un délai apparent de l'ordre de 0,5 ms (Figure II-10.B). Ce phénomène est la conséquence des propriétés intrinsèques du stimulateur piézo-électrique et du filtrage non linéaire utilisé.

L'élément piézoélectrique exhibe une résonance mécanique à ~ 4 kHz lorsqu'il porte une fibre. Pour éviter que l'extrémité de la fibre ne manifeste des oscillations à cette fréquence en réponse à une stimulation en créneau, il est nécessaire de filtrer le signal de commande à une fréquence inférieure (Figure II-11).

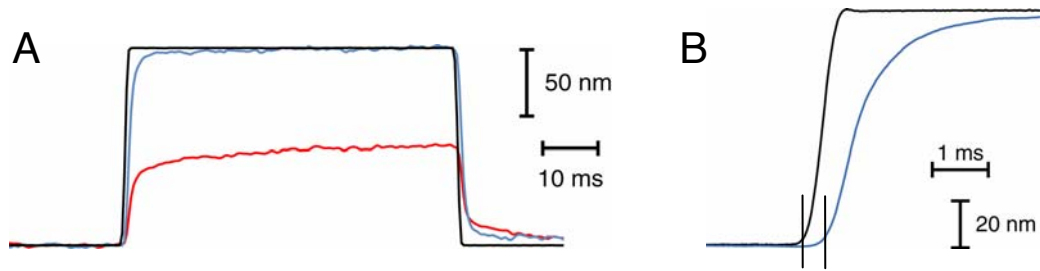


Figure II-10 : **A.** Mouvement mesuré pour une fibre libre (trace bleue) et la même fibre couplée à une touffe ciliaire (trace rouge) pour un déplacement de commande $\Delta = 150$ nm (trace noire). Raideur et friction de la fibre : $K_F = 0,594$ pN/nm, $\zeta_F = 5,23 \cdot 10^{-5}$ pN·s/nm. Raideur de la touffe ciliaire (mesurée entre 3 et 5 ms après l'activation du stimulus) : $K_o = 0,758$ pN/nm. Le temps de montée (5-95%) du mouvement de la fibre est ici de 1,2 ms. **B.** Déplacement de commande (noir) et mouvement résultant (bleu) d'une fibre libre rigide (acquisition à 25 kHz, filtré à 1 kHz). On note un délai de 0,4 ms entre la montée de la commande et l'initiation du mouvement de la fibre.

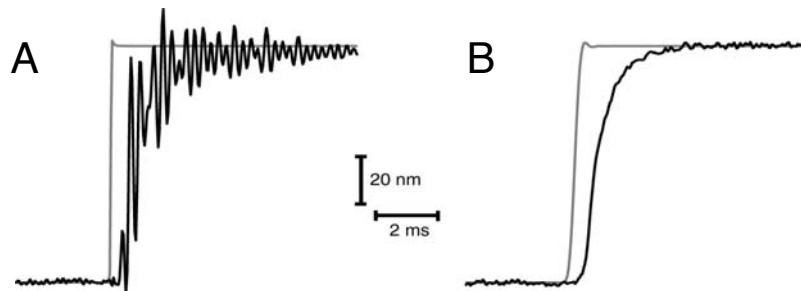


Figure II-11: Réponse de l'extrémité d'une fibre libre à une marche de déplacement appliquée à sa base (gris : commande envoyée au piézoélectrique ; noir : mesure de la position de l'extrémité de la fibre). Acquisition à 20 kHz, signal filtré à 10 kHz. **A.** commande filtrée à 10 kHz. **B.** commande filtrée à 1 kHz ; les oscillations disparaissent.

B.3. Détection des mouvements de la fibre et de la touffe ciliaire

B.3.1. Formation des images

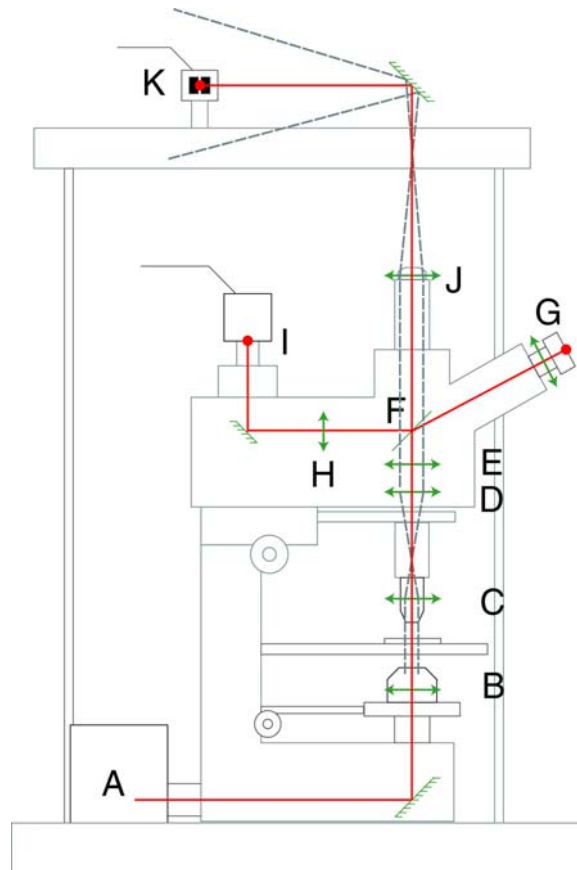


Figure II-12 : Schéma des trajets optiques.

La touffe ciliaire est imagée, au travers d'un microscope droit (*BX51WI – Olympus*) équipé d'un objectif à immersion à eau $\times 60$ d'ouverture numérique 0,9 (voir la figure II-12). L'éclairage de l'échantillon est assuré par une lampe à vapeur de mercure de 100 W (**A** sur la figure II-12 – *HBO 103 W/2 – Osram*) et un condenseur, réglé en illumination de Köhler (**B**). Sur le trajet **AB**, des filtres d'intensité viennent limiter le flux lumineux lorsque aucune acquisition n'est en cours, et un filtre sélectionne les raies vertes du spectre d'émission du mercure et coupe celles dans le bleu et l'ultraviolet, qui entraîneraient l'apparition de radicaux libres nocifs (filtre passe-bande $\lambda_c = 525 \pm 30$ nm).

Une image intermédiaire est formée par l'objectif (**C**) et la lentille de tube du microscope (**E**). Une lentille relais (**D**) permet de multiplier le grandissement offert par l'objectif par $\times 1,25$. Un axe coulissant (**F**) permet de rediriger la lumière soit vers les oculaires (**G**), soit vers les photodiodes (**K**) ou, grâce à un miroir semi réfléchissant, d'en prélever 25% pour observer l'échantillon à l'aide d'une caméra

CCD (**I** – LCL-902K – *Watec America corp*) et d'envoyer les 75% restants vers les photodiodes. Sur le trajet **FI**, une lentille intermédiaire (**H**) de grandissement $\times 4$ donne une image agrandie d'une touffe ciliaire par la caméra CCD. Les rayons lumineux (quasi-parallèles) envoyée vers les photodiodes passent par un projectif $\times 4$ (**J**) qui les fait diverger. On forme ainsi sur les photodiodes – qui servent d'écran – une projection de l'échantillon, dont le grandissement croît lorsque l'on éloigne les photodiodes de **J**. Celles-ci sont positionnées à une distance d'environ 30 cm de **J**, de sorte à obtenir un grandissement total de $\times 1000$.

B.3.2. Détection par photodiode à deux quadrants

Nous avons construit un système de mesure autour d'un capteur à deux photodiodes dont le principe est le suivant (Figure II-13). On forme une image de la fibre à cheval sur deux photodiodes *A* et *B* (*Spot 2D – UDT sensors Inc.*) chacune de surface active $1,3 \times 2,5 \text{ mm}^2$ accolées horizontalement, de telle manière à ce que le déplacement de la fibre soit dans la direction orthogonale à celle de leur coté commun. On connecte chacune de ces photodiodes à un convertisseur courant/tension de gain 10^7 V.A^{-1} ce qui fournit deux tensions V_A et V_B . Ces deux signaux sont amplifiés $10\times$ et soustraits dans un second étage d'amplification (schéma de principe donné dans l'annexe E). Le signal résultant est ensuite amplifié une seconde fois par un amplificateur de gain variable 1-10 avant d'être filtré par un filtre passe-bas de Bessel à 8 pôles (*Model 3384 filter - Krohn-Hite Corporation*) avec une fréquence de coupure à 3 dB de 1 kHz (sauf mention contraire) et est digitalisé par un convertisseur 12 bits (*PCI-MIO-16E-1 - National Instruments*). L'acquisition est assurée par un ordinateur piloté par le logiciel LabView (*LabView 6i et 7.1 - National Instruments*), à une fréquence de 2,5 kHz. Ce système photométrique peut détecter des mouvements de $1 \mu\text{m}$ de l'image formée. Comme les photodiodes sont placées de telle manière à ce que le microscope offre un grandissement de $\times 1000$, on obtient une résolution théorique sur les déplacements de l'ordre du nanomètre.

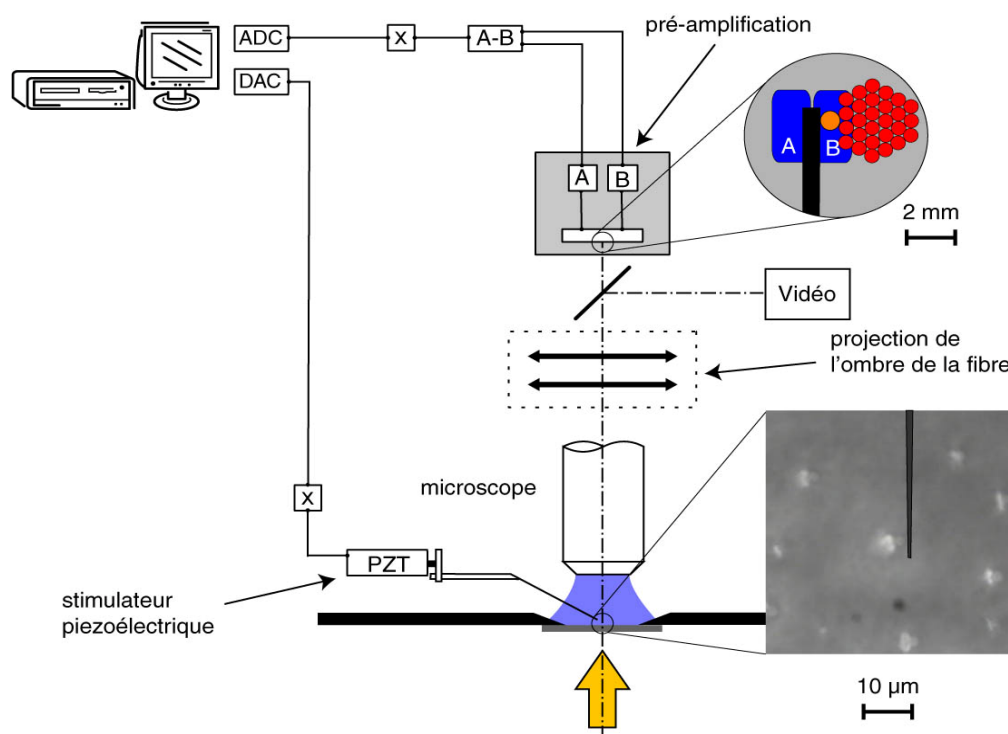


Figure II-13 : Observation d'une touffe ciliaire. L'épithélium sensoriel est vu de dessus par vidéo microscopie (image en bas à droite) et une fibre est couplée au bulbe kinociliaire de la cellule d'intérêt. Son image est projetée sur une paire de photodiodes (représentée schématiquement en haut à droite). Même sans fibre, il est possible de mesurer les mouvements de la touffe ciliaire en imageant la rangée de stéréocils la plus longue sur les photodiodes, avec une résolution moindre, mais toutefois suffisante pour suivre ses oscillations spontanées.

Si la fibre se déplace par exemple en direction de la photodiode A , celle-ci recevra un flux lumineux moindre (la fibre est opaque et son image est noire sur fond clair), la photodiode B un flux plus grand et V_B croît tandis que V_A décroît. Tant que les déplacements de la fibre sont petits devant sa largeur, et tant que son ombre reste à cheval sur les deux photodiodes, la quantité $V_X = V_A - V_B$ est proportionnelle au déplacement de la fibre. La gamme des déplacements mesurables est limitée par la zone de linéarité pour laquelle la tension en sortie des photodiodes est proportionnelle au déplacement de l'objet qu'on image sur elles. Si celui-ci est une fibre, on comprend que l'on ne peut pas mesurer des déplacements plus grands que le diamètre de la fibre : au delà, son image n'est plus à cheval sur les deux photodiodes et le signal perd son sens. Cette borne supérieure est diminuée de la distance qui sépare les deux quadrants des photodiodes ; sur notre modèle, celle-ci est de $127\ \mu\text{m}$, ce qui correspond à $127\ \text{nm}$ au niveau de la préparation. On a donc intérêt à fabriquer des fibres dont l'épaisseur fait plusieurs centaines de nm. On voit ci-dessous (Figure II-14) que le domaine de linéarité est limité ; si l'on veut éviter que la non linéarité du détecteur ne rajoute une erreur sur les mesures de raideurs, il

faut se cantonner au domaine linéaire central de 400 nm, ce qui est suffisant pour nos mesures.

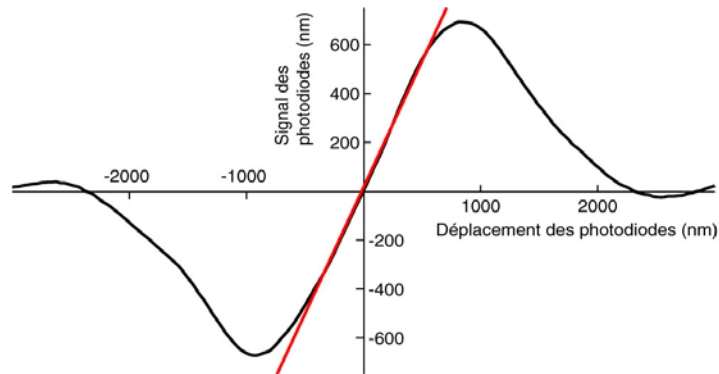


Figure II-14 : Caractérisation de la linéarité de la détection. Courbe noire : signal calibré (en nanomètres) donné par le système photométrique lorsqu'on fait traverser le champ des photodiodes à l'image d'une fibre ($K_F = 0,392 \text{ pN/nm}$, $\xi_F = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ pN.s/nm}$). Courbe rouge : ajustement linéaire par $Y = 1,034 \cdot X + 14 \text{ nm}$ sur la gamme $[-500 \text{ nm}, 500 \text{ nm}]$.

Nous avons mesuré la réponse fréquentielle de notre système de détection à l'aide d'un laser infrarouge et d'un déflecteur acousto-optique⁷. Le spot laser est imagé sur les deux photodiodes et l'on fait osciller sa position sinusoïdalement à l'aide du déflecteur, jusqu'à 100 kHz (nous nous sommes assurés auparavant, à l'aide d'un autre système de détection dont la bande passante est plus large, que le déflecteur est capable de reproduire fidèlement une sinusoïde sans atténuation jusqu'à cette fréquence). Le spectre obtenu (Figure II-15) présente une fréquence de coupure à 3 dB de 1,7 kHz. Bien que limitée, la bande passante du système de détection est suffisante pour nos applications. En effet, la raideur typique d'une touffe ciliaire est de $K_\infty = 1 \text{ pN/nm}$ et son coefficient de friction λ a une valeur minimale $2 \cdot 10^{-4} \text{ pN.s/nm}$, ce qui donne à la touffe ciliaire une fréquence de coupure d'environ 800 Hz. Le stimulateur permet d'imposer une série de marches de déplacement avec un pas d'un nanomètre entre elles que le détecteur parvient à discriminer (Figure II-16).

De toutes les imperfections de l'appareillage, la dérive est la plus néfaste pour nos mesures. Certaines nécessitent de bien connaître l'origine des déplacements sur des intervalles de temps qui peuvent être longs et deux sources de dérives viennent l'altérer. Si l'on image une immobile sur les photodiodes, le signal qu'elles délivrent ne garde pas une valeur constante même si la base de la fibre est sensée demeurée à une position fixe. Sur 1 mn, qui est la durée moyenne que prend une mesure d'une courbe force/déplacement d'une touffe ciliaire, cette dérive présente une excursion maximale de 80 nm avec une vitesse maximale de 12 nm/s et

⁷

Pour cette calibration, j'ai bénéficié de l'aide et de l'équipement de Pierre-Yves Plaçais et de Martial Balland.

n'affiche pas de biais. Si l'on image une mire micrométrique fixée sur la platine du microscope, on observe également une dérive du signal délivré par les photodiodes. Son excursion maximale est de 60 nm avec une vitesse maximale de 10 nm/s.

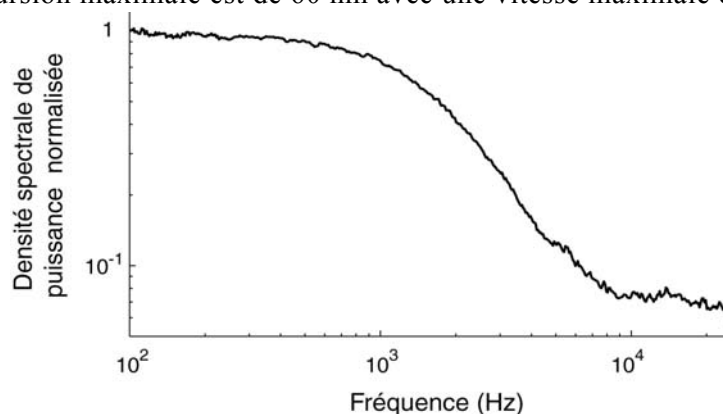


Figure II-15 : Spectre de réponse du système photométrique.

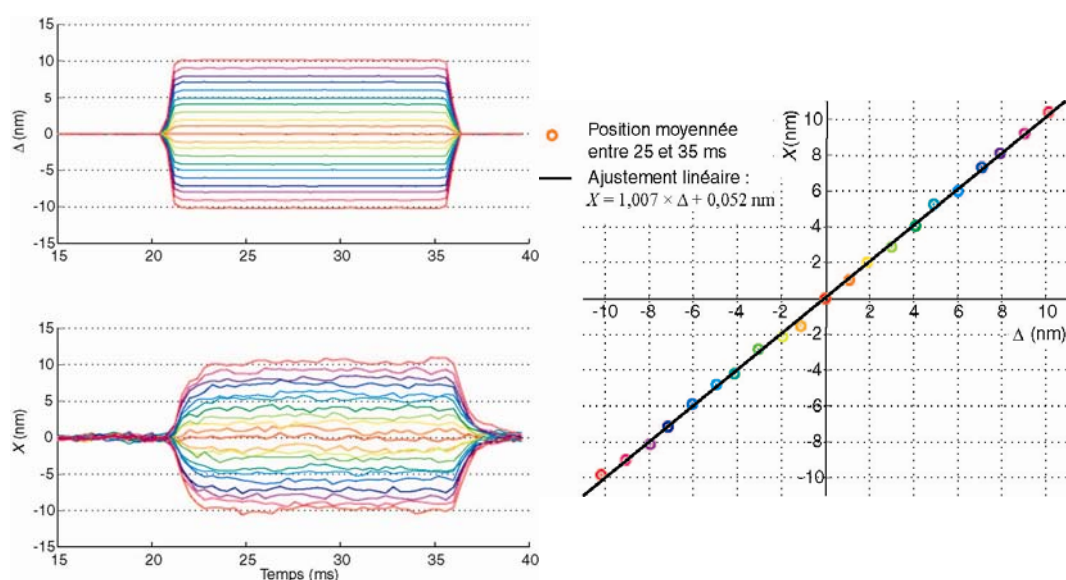


Figure II-16 : Génération et mesure de marches de déplacements pour une fibre libre. Δ est le déplacement imposé à la base de la fibre, X le déplacement mesuré à son extrémité (signal filtré à 1 kHz, acquis à 2,5 kHz, moyenné 20 fois).

Sur des durées plus longues, nécessaires lorsque l'on cherche à mesurer plusieurs courbes force/déplacement en conservant la même origine, la dérive de la platine affiche un biais qui peut aller jusqu'à 300 nm sur plus de 3 heures dans le cas le plus défavorable rencontré. Il existe également un biais dans la direction horizontale orthogonale de 900 nm dans les mêmes conditions. La dérive verticale, associée à une perte du focus de l'image, est inférieure à ce qui est quantifiable par nos moyens. Ceci est une sous estimation des problèmes rencontrés lors d'une manipulation avec une préparation. En effet son état se dégrade au cours de l'expérience : elle se déforme, s'affaisse et il est souvent nécessaire de

repositionner la touffe ciliaire au centre de l'image vidéo et de remettre l'image au point.

B.3.3. Centrage et calibration du signal

Les photodiodes et le circuit de pré-amplification sont montés sur un stimulateur piézoélectrique (*Piezzosystem Jena*), lui même fixé sur une platine XY (*M406 - Newport*). La platine XY possède un axe horizontal motorisé et commandé par un contrôleur (*ESP300 - Newport*), qui permet au cours d'une expérience de réaliser le centrage des photodiodes sur l'image de la fibre au repos. Le fonctionnement de l'axe motorisé produit des vibrations parasites ; afin qu'elles ne soient pas transmises à la préparation, le système photométrique et la platine motorisée sont fixés sur une seconde table optique placée au dessus du microscope et mécaniquement découplée de celui-ci.

La calibration du signal de sortie se fait à l'aide du stimulateur piézoélectrique, sur lequel est monté le système photométrique. Alors que la touffe ciliaire ou la fibre imagée sur le détecteur est immobile, on impose à ce stimulateur une série de marches d'amplitude connue. C'est alors la paire de photodiodes qui se déplacent, mais le voltage généré est identique à celui qu'aurait donné un déplacement connu de l'objet, au facteur de grandissement optique près. Le signal obtenu permet de vérifier la linéarité de la détection et d'obtenir la calibration de celle-ci. Cette méthode autorise en outre la calibration du détecteur alors même qu'une fibre est attachée à une touffe ciliaire sans avoir à la manipuler de manière intempestive. Avec une préparation sous l'objectif et dans des conditions usuelles de travail, la constante de calibration est typiquement de 20 mV/nm.

Sa valeur dépend grandement des conditions expérimentales et la calibration doit être refaite plusieurs fois au cours d'une même expérience. En répétant le protocole de calibration avec une fibre immobile, on trouve que la dispersion de cette valeur pour un même objet est d'environ $\pm 5\%$. Cette imprécision est plus grande lorsque l'on calibre le signal avec une cellule oscillante et dépend également de l'amplitude de ces oscillations.

B.4. Fonctionnement en déplacement imposé

Pour imposer un déplacement de la touffe ciliaire, et mesurer la force nécessaire pour obtenir et maintenir ce déplacement, un circuit électronique (dont le schéma de principe est donné dans l'annexe E) compare une tension de commande V_C au signal électrique fourni par les photodiodes V_X . Il compose ainsi un signal d'erreur qui sert de commande au stimulateur piézoélectrique. Le dispositif de rétroaction est décrit ci-dessous, et est inspiré de [Martin *et al*, 2001].

Un module électronique réalisant analogiquement la boucle de rétroaction a été réalisé. Il fait la différence entre un signal de commande V_C et le signal provenant des photodiodes V_X , tous deux filtrés sauf mention contraire par un passe bas de fréquence de coupure $f_c = 1$ kHz. Le signal d'erreur résultant $V_e = V_C - V_X$ est envoyé sur un module Proportionnel-Intégrateur-Dérivateur (PID) dont les gains et les constantes de temps sont ajustables manuellement. La composante intégrale permet de s'affranchir de la dérive qui apparaît sur des échelles de temps longues, la composante dérivée permet de contrer les mouvements rapides. Enfin, la résultante est filtrée par un passe-bas monopôle dont la fréquence de coupure est ajustable autour de 70 Hz, avant d'être prise comme signal de commande pour le piézoélectrique de la fibre (Figure II-17 ; voir également l'annexe E pour le détail du schéma électronique). Ce dernier filtre permet de stabiliser la boucle de rétroaction en atténuant les composantes haute-fréquence du signal. La fonction de transfert \tilde{G} de la boucle de rétroaction s'écrit donc

$$\tilde{G} = \frac{G_A}{1 + j\omega\tau_F} \left(G_P + G_I \frac{1}{1 + j\omega\tau_I} + G_D \frac{j\omega\tau_D}{1 + j\omega\tau_D} \right)$$

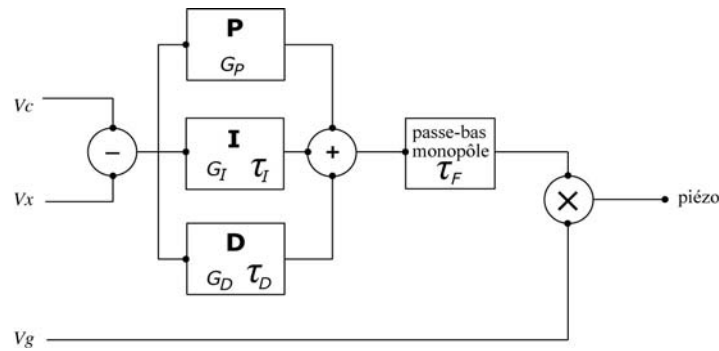


Figure II-17: Commande du piézoélectrique en boucle fermée

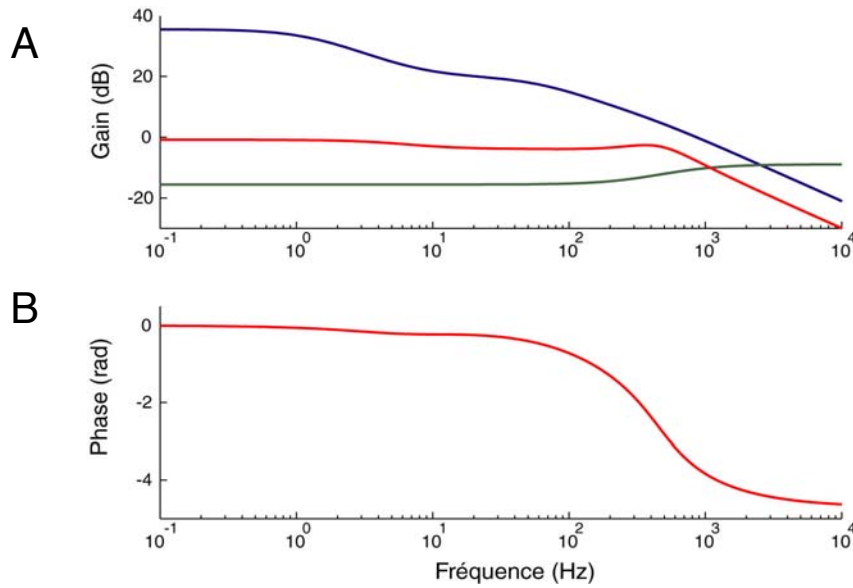


Figure II-18 : **A.** Gain en dB des fonctions de transfert (bleue : fonction de transfert de la boucle de rétroaction, vert : gain en boucle ouverte, rouge : gain en boucle fermée). **B.** Phase de la fonction de transfert du gain en boucle fermée. Pour tracer ces courbes, les valeurs suivantes ont été prises : $K_F = 0,2 \text{ pN/nm}$, $K_{HB} = 1 \text{ pN/nm}$, $\xi_F \approx 8.10^{-5} \text{ pN.s/nm}$, $\xi'_F = 1.10^{-4} \text{ pN.s/nm}$, $\xi_{HB} = 2.10^{-4} \text{ pN.s/nm}$, $\tau_I = 175 \text{ ms}$, $\tau_D = 0,5 \text{ ms}$, $\tau'_D = 0,1 \text{ ms}$ et $\tau_F = 2,5 \text{ ms}$.

Les paramètres τ_I et τ_D sont ajustés une fois pour toutes les expériences postérieures, par tâtonnement jusqu'à ce que le système permette de maintenir une cellule oscillante à une position fixe. Les valeurs actuelles sont les suivantes : $\tau_I = 175 \text{ ms}$, $\tau_D = 0,5 \text{ ms}$, $\tau'_D = 0,1 \text{ ms}$ et $\tau_F = 2,5 \text{ ms}$. Les gains G_P , G_I et G_D sont choisis pour chaque cellule jusqu'à obtenir une marche de déplacement fidèle à la commande (Figure II-20). Une tension de contrôle V_g permet de modifier le gain global du PID G_A entre 0 et 1, et ainsi d'échelonner le gain global de la boucle de rétroaction.

B.5. Iontophorèse de composés chargés

La iontophorèse est une technique qui permet d'éjecter des substances chargées d'une micropipette de verre, et donc de modifier l'environnement ionique local d'une touffe ciliaire. Elle peut être utilisée avec tout composé chargé ; la iontophorèse de chlorure de calcium permet d'augmenter la concentration de calcium, mais on peut l'abaisser en éjectant un chélateur de cet ion (nous avons utilisé principalement l'ATP, dont la constante de complexation avec le calcium est 3722 mol.L^{-1} [Wilson, J. E. & Chin, 1991] et le triphosphate). On peut aussi éjecter des bloqueurs du canal [Jaramillo & Hudspeth, 1991] ou des tétracarboxylates qui

viennent cliver les liens de bout de cil d'une seule touffe ciliaire [Jaramillo & Hudspeth, 1993]. Cette technique comporte de nombreux avantages :

- contrairement à un changement de milieu ionique par rinçage, il n'est pas nécessaire de découpler fibre et touffe ciliaire. Pour une série de mesures, ce couplage sera donc toujours le même, en particulier à la même hauteur sur le kinocil, ce qui est capital pour pouvoir attribuer les changements de caractéristiques mécaniques observés à la modification du milieu ionique et non à des erreurs de répétabilité ;
- dans la limite que permet la dérive de l'appareillage, on a toujours accès à l'origine absolue des déplacements quel que soit le milieu ;
- on modifie de manière transitoire la concentration en un ion, ce qui donne accès à la réponse temporelle de la touffe ciliaire lors de cette modification. Le changement d'environnement ionique est rapide avec la iontophorèse (quelques dizaines de ms), comparé aux temps que demande les échanges complet des milieux (environ 1 mn). Ce facteur est important, car la fenêtre temporelle pendant laquelle une cellule ciliée reste intègre peut être courte ;
- on ne perturbe que l'environnement d'une cellule, ce qui peut se révéler important lorsque les drogues qu'on éjecte sont toxiques.

La gêne causée par des micropipettes qui se bouchent au cours de l'expérience, dont la distance à la touffe ciliaire varie et qui peuvent venir l'empaler sous l'action de la dérive est la contrepartie de ces avantages. Il faut lui ajouter la difficulté de manipuler un élément supplémentaire sous l'objectif.

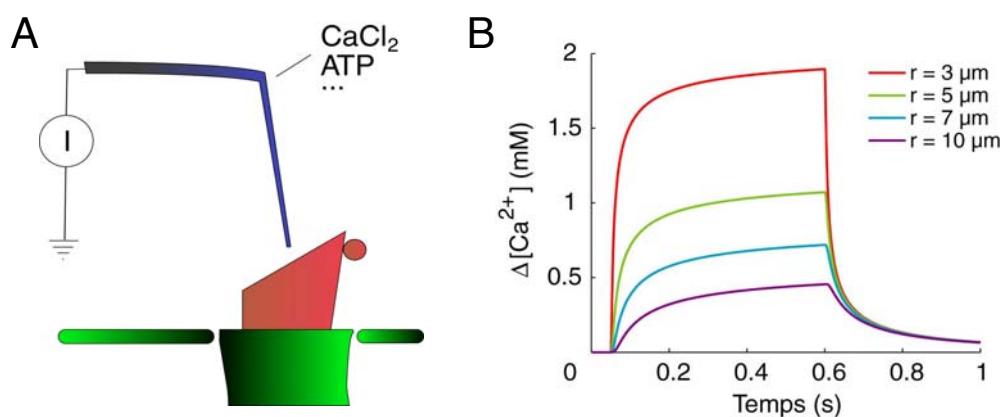


Figure II-19 : **A.** Principe de l'iontophorèse. Un générateur et une paire d'électrodes sont utilisés pour passer du courant au travers d'une micropipette de verre, dont la pointe est au voisinage d'une touffe ciliaire. Comme les ions contenus dans la micropipette portent une partie du courant, certains de ces ions seront éjectés à proximité de la touffe ciliaire. **B.** Profil théorique de l'augmentation de concentration en calcium due à la iontophorèse de CaCl_2 pour un courant de +50 nA et différentes distances à la pointe de la micropipette (transférance $\zeta=12\%$).

B.5.1. Réalisation expérimentale

Des micropipettes sont fabriquées à partir de capillaires de verre (borosilicate, diamètre 1,2 mm, *WPI*), allongés à chaud à l'aide d'une étireuse à filament (modèle P97, *Sutter Instrument*), puis courbés avec un angle d'environ 90° en leur extrémité pour pouvoir être manipulé sous l'objectif. Dans chacune de ces micropipettes est insérée une électrode à Ag/AgCl.

Les électrodes à Ag/AgCl sont fabriquées à partir d'un fil d'argent (diamètre 250 μm , *Good fellow*) plongée dans un bain d'acide chlorhydrique 2,5 M et branché à la borne + d'une pile 9 V. Un fil de platine (250 μm , *Good fellow*) est branché à la borne – et plongé dans le même bain. Un potentiomètre permet de régler l'intensité qui traverse le circuit, que l'on ajuste de telle manière à ce que la formation de petites bulles soit visible sur le fil de platine. Au bout d'une vingtaine de minutes, on obtient une électrode de teinte grise homogène. Une autre méthode consiste à plonger un fil d'argent dans un bain d'eau de Javel commerciale pendant 30 mn.

	solution	polarité du courant de commande	transférance ζ
augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]$	CaCl_2 - 2,5 M	+	12%
diminution de $[\text{Ca}^{2+}]$	Na_2ATP - 350 Mm	–	/
	Na_3TP - 470 mM triphosphate	–	/
	Antipyrylazo - 100 mM	–	/
bloqueur des canaux	gentamicine sulfate - 500 mM	+	1,3% ⁸

Tableau II-2 : Solutions utilisées pour la iontophorèse.

Avec du chlorure de calcium à la concentration 2,5 M et dans l'endolymphe-NMDG, la résistance électrique de ces micropipettes varie entre 5 et 100 M Ω . Une électrode de masse Ag/AgCl est placée dans l'endolymphe et un générateur (*Axoclamp-2A*, *Axon Instruments Inc.*) est utilisé pour passer un courant imposé au travers de ces micropipettes, variant selon la solution de iontophorèse de –100 nA à + 200 nA (Tableau II-2). Pour compenser la diffusion des ions contenus dans la micropipette lorsqu'aucun courant ne la traverse, on applique un courant de retenue constant dont l'amplitude est déterminée empiriquement en approchant la micropipette d'une cellule oscillante : lorsque les oscillations restent identiques quelle que soit la distance à la pointe de la micropipette, on considère que le

⁸
[Jaramillo & Hudspeth, 1991]

courant de retenue parvient à empêcher suffisamment cette diffusion passive pour ne pas perturber la cellule. Sa valeur absolue varie selon la taille du pore de la micropipette de 0,2 nA à 20 nA.

B.5.2. Estimation de la concentration obtenue

Il est possible d'estimer l'augmentation de concentration locale en l'ion concerné [Berg, 1993]. L'endolympe dans laquelle est éjecté l'ion d'intérêt est un milieu ionique conducteur ; son volume peut être considéré comme équipotentiel (au potentiel de masse). Les ions diffusent donc depuis l'extrémité de la micropipette. Soit dN la quantité d'ions éjectés pendant dt . On définit ζ la transference d'un ion dans une solution donnée comme la proportion du courant total I porté spécifiquement par cet ion. Si z_{Ca} est sa valence et e la charge d'un proton, alors

$$dN = \frac{\zeta I}{z_{Ca} e} dt$$

Supposons qu'à $t=0$ on impose un courant I pendant une durée T . Pour $t < T$, les ions vont diffuser librement dans un milieu qu'on supposera infiniment grand avec un coefficient de diffusion D_{Ca} . L'augmentation de concentration qui en suivra à l'instant $t < T$ en r s'écrit (en m^{-3})

$$C(r, t) = \frac{\zeta I}{4\pi D_{Ca} z_{Ca} e r} \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{\sqrt{4D_{Ca} t}}\right)$$

où erfc est la fonction d'erreur complémentaire. Si T est grand devant $r^2/2D_{Ca}$ ⁹, la concentration atteint sa valeur en régime permanent

$$C_{\infty}(r) = \frac{\zeta I}{4\pi D_{Ca} z_{Ca} e r}$$

Pour $t > T$, on coupe le courant et l'augmentation de concentration vaut alors

$$C(r, t) = \frac{\zeta I}{4\pi D_{Ca} z_{Ca} e r} \left\{ \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{\sqrt{4D_{Ca} t}}\right) - \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{\sqrt{4D_{Ca} (t-T)}}\right) \right\}$$

Des profils de C sont présentés plus haut (Figure II-19.B) dans le cas d'une iontophorèse de $CaCl_2$ en attribuant une transference de 12% au calcium. La distance à la touffe ciliaire est mesurée par vidéo à l'aide d'un appareil de traitement d'image (*Argus image processor* – Hamamatsu). Typiquement dans nos expériences, la pointe de la micropipette est placée dans le plan d'observation à $\sim 5 \mu m$ d'une touffe ciliaire qui a un diamètre de $\sim 4 \mu m$; en toute rigueur tous les

⁹ Avec $D \approx 800 \mu m^2/s$ pour le calcium [Weast, R. C., 1985], $r^2/2D \approx 30 ms$ à $5 \mu m$, $r^2/2D \approx 10 ms$ à $3 \mu m$

canaux ne sont donc pas soumis à la même cinétique d'augmentation du calcium, ni à la même concentration statique.

B.5.3. Détermination de la transférance du calcium

Nous avons déterminé la valeur de la transférance du calcium pour une micropipette remplie de CaCl_2 par un dosage fluorométrique. Une solution à laquelle on n'a pas ajouté de calcium en contient néanmoins ~ 200 nM. Pour abaisser cette concentration, on fait passer une solution d'endolympe sur une colonne contenant des billes recouvertes d'un chélateur du calcium (BAPTA ; *Calcium sponge – Molecular probes*). Dans un premier temps, celle-ci est utilisée conjointement à une série de solutions de calcium tamponnée par l'EGTA (*Calcium calibration buffer kit #1 – Molecular probes*) pour étalonner un fluorimètre avec la sonde fluorescente fluo-3 ou X-rhod-5F (*Molecular probes*) à la concentration $3 \mu\text{M}$.

Par la suite, un volume V_{cuve} de $400 \mu\text{L}$ de cette solution est placé dans une cuve (*115-QS – Hellma*) et soumis à une iontophorèse de CaCl_2 pendant un temps déterminé. Pour éviter que la micropipette ne se bouche, le courant I_{Ca} (typiquement 50 nA mesuré à partir du courant de retenue) est envoyé par pulses (typiquement avec une durée T_{pulse} de 100 ms), pendant une durée de l'ordre de 4 h (soit un nombre N_{pulse} de pulses de $5 \cdot 10^4$ à 10^5). La variation de la concentration en calcium est ensuite mesurée par fluorométrie. La connaissance du courant total envoyé et la mesure de la concentration de calcium atteinte permet de déterminer ζ , par la formule

$$\zeta = \frac{\Delta[\text{Ca}^{2+}] V_{\text{cuve}} N_{\text{A}} z_{\text{Ca}} e}{T_{\text{pulse}} N_{\text{pulse}} I_{\text{Ca}}}$$

où N_{A} est le nombre d'Avogadro, z_{Ca} est la valence du calcium, et e la charge d'un proton.

Une estimation de la précision de la méthode peut être obtenue en utilisant KCl comme solution de iontophorèse à la place de CaCl_2 . La variation $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ mesurée est alors de ~ 100 nM, ce qui donne l'erreur faite lors d'une mesure. Sur 3 mesures où $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ excède 200 nM, nous avons calculé une valeur de ζ_{CaCl_2} valant $11,7 \pm 5,1\%$.

B.6. Calibration du dispositif

Le but de la calibration globale du dispositif est d'obtenir les constantes de calibration permettant de relier la tension fournie par les photodiodes à un déplacement au niveau de la préparation, et la tension de commande envoyée au

stimulateur piézoélectrique à un déplacement de la base de la fibre. Outre la calibration du signal de sortie, automatisé et que l'on répète à chaque expérience (voir le paragraphe B.3.3), cette calibration comporte trois étapes, et n'est pas à répéter pour chaque expérience.

B.6.1. Calibration du grandissement optique

On veut s'assurer que la projection de l'image obtenue sur les photodiodes ait un grandissement de $\times 1000$. Pour ce faire, on image une règle micrométrique avec des graduations rectilignes séparées de $10\text{ }\mu\text{m}$. On place sur les photodiodes une série de repères séparés de 1 cm et l'on cherche la position des photodiodes où la projection des lignes de la mire se superpose aux repères. Ceci fait, la platine porteuse des photodiodes est fixée et laissée en cette position.

Les marques de la mire micrométrique utilisée pour la calibration ont une certaine épaisseur qui vient limiter la précision atteignable ; celle-ci est d'au mieux 5% et le grandissement vaut 1000 ± 50 . Cette erreur est une erreur systématique et constante, qui n'affecte que la valeur absolue des mesures. Elle est la même pour toutes les mesures reportées dans ce manuscrit.

B.6.2. Calibration de l'élément piézoélectrique des photodiodes

La paire de photodiodes et le circuit électronique adjoint sont fixés au bout d'un élément piézoélectrique qui permettra ultérieurement la calibration du signal de sortie (voir le paragraphe B.3.3). Il faut pouvoir relier la tension de commande envoyée à cet élément à son déplacement obtenu.

Deux méthodes sont possibles : la première consiste à imager une fibre rigide immobile (ou un repère de la mire micrométrique) sur les photodiodes et à utiliser la platine motorisée qui porte l'ensemble du dispositif de détection. L'axe moteur de cette platine est calibré par le fabricant et permet d'envoyer des marches de déplacement d'amplitude connue, qui donnent des variations du signal de sortie. Ces variations donnent une première constante de calibration C_1 reliant le mouvement de la platine motorisée avec le signal de sortie donné par les photodiodes (unité : m.V^{-1}). Ensuite, toujours avec la même fibre imagée, on envoie des marches de tension à l'élément piézoélectrique et l'on mesure également le signal fourni par les platines. On obtient ainsi une seconde constante de calibration C_2 reliant la tension de commande de l'élément piézoélectrique à la tension en sortie des photodiodes (unité : V.V^{-1}). La constante de calibration finale, reliant le déplacement des photodiodes à la tension de commande de l'élément piézoélectrique est alors simplement donnée par $C_A = C_1/C_2$ (unité : m.V^{-1}).

Une autre possibilité consiste simplement à utiliser la boucle de rétroaction de l'élément piézoélectrique (qui utilise une mesure des déplacements grâce à une jauge de contrainte) permettant de le faire fonctionner en déplacement imposé. On utilise alors directement la constante de calibration de la boucle de rétroaction fournie par le constructeur.

B.6.3. Calibration du stimulateur piézoélectrique

Les deux éléments piézoélectriques de notre appareillage électronique possèdent une boucle de rétroaction qui permet de les faire fonctionner en déplacement imposé. Mais les temps de montée des déplacements obtenus sont de l'ordre de 30 ms, ce qui est trop long pour être utilisé comme stimulation dans nos applications. L'élément piézoélectrique du stimulateur doit donc être utilisé et calibré en boucle ouverte. Pour ce faire, une fibre rigide est fixée au stimulateur et imagée sur les photodiodes. Le signal de sortie des photodiodes est d'abord calibré (voir le paragraphe B.3.3), puis une série de marche de tension est envoyée au stimulateur piézoélectrique. Ceci permet d'obtenir une constante de calibration C_3 (unité : $V.V^{-1}$) reliant la tension de commande du stimulateur à la tension fournie par les photodiodes. La connaissance de la calibration C_4 (unité : $m.V^{-1}$) reliant le déplacement mesuré au niveau des photodiodes à la tension qu'elles fournissent et du grandissement optique C_5 (valant $\times 1000$) permet de déduire la constante de calibration reliant le déplacement de la base de la fibre à la tension de commande du stimulateur par $C_B = C_3 \cdot C_4 / C_5$ (unité : $m.V^{-1}$). La dispersion sur la constante de calibration, estimée en répétant la calibration pour une même fibre, a une valeur d'environ $\pm 4\%$.

C. Procédures de stimulation d'une touffe ciliaire

C.1. Stimulation par une série de marches

Les propriétés mécaniques d'une touffe ciliaire sont étudiées principalement en la stimulant à l'aide de marches de déplacement. Ce procédé de stimulation permet de mettre en évidence le phénomène d'adaptation, le twitch (dans les conditions où il est observable) et d'obtenir la courbe force/déplacement d'une touffe ciliaire. Cette stimulation peut prendre la forme d'une marche de déplacement de la base de la fibre (fonctionnement en boucle ouverte) ou d'une marche de déplacement de la touffe ciliaire (fonctionnement en déplacement imposé). Nous décrivons ici les caractéristiques du fonctionnement en boucle

ouverte lors d'une stimulation par une série de marches de déplacements de la base de la fibre.

Une fibre est couplée au bulbe de la touffe ciliaire et une série de marches tests sont envoyées. Leur amplitude Δ est choisie de telle manière à ce que les déplacements X de la touffe ciliaire résultants couvrent au moins la totalité de la région non-linéaire de la relation F/X de la touffe ciliaire, soit une gamme de ± 100 à ± 200 nm autour de l'origine ($X = 0$). Comme la rigidité de la fibre est en général 0,2-1 fois celle de la touffe ciliaire, des déplacements de la base de la fibre aussi grands que ± 1 μm sont parfois nécessaires. La marche de déplacement de la base de la fibre est maintenue pendant une durée suffisamment longue pour permettre la complétion de l'adaptation, typiquement une centaine de millisecondes. Pendant cette durée, l'extrémité de la fibre se déplace encore, manifestant la relaxation mécanique signature de l'adaptation lente et que l'on peut discriminer d'un artefact due à la fibre (Figure II-10). À la fin d'une marche test, la base de la fibre est ramenée à sa position d'origine ($\Delta = 0$) et maintenue en ce point pendant une durée similaire à celle de la marche. On est sûr ainsi qu'à la fin d'une marche test, juste avant que la suivante ne soit appliquée, la cellule a retrouvé son état initial non stimulé et n'est pas en train d'adapter. Pour des raisons liées à l'hystérésis du matériau piézoélectrique qui constitue le stimulateur (voir l'annexe D), les marches ont une polarité alternée : avec des marches non alternées, l'hystérésis vient biaiser la position de la touffe ciliaire. Leur nombre est choisi de telle manière à avoir une bonne résolution dans la région non-linéaire, mais le prendre trop grand conduit à des temps de mesure trop longs, ce qui n'est pas souhaitable : notre appareillage est soumis à une dérive lente, qui vient modifier l'état de la cellule et fausser la mesure, la fibre a plus de chance de se décrocher, et la durée de vie de la cellule est limitée. Typiquement, chaque mesure de twitch ou d'une caractéristique force/déplacement est réalisée avec un nombre de marches variant entre 20 et 60.

C.2. Mesure des courbes force/déplacement

C.2.1. Mesures en boucle ouverte

Les propriétés mécaniques d'une touffe ciliaire peuvent être inférées à partir de la mesure de sa caractéristique force/déplacement. Une fibre est couplée au kinocil, et dans le cas du fonctionnement en boucle ouverte, une série de marches de déplacements est imposée à la base de la fibre. La touffe ciliaire répond avec une dynamique complexe (voir le paragraphe précédent). La position $X(t)$ de la touffe ciliaire est enregistrée, ainsi que la commande $\Delta(t)$ de la base de la fibre. Leur connaissance permet de déduire la force appliquée à la touffe ciliaire par

$F(t) = K_F (\Delta(t) - X(t))$. La mesure de position et de force se fait quelques millisecondes après l'initiation du déplacement : il faut attendre la disparition du pic visqueux dans la force mesurée (terme en $\lambda \dot{X}$ dans l'équation I.13), et faire la mesure avant que le phénomène d'adaptation ne relaxe la tension (pour pouvoir supposer que X_a reste constant). Dans le cas de nos mesures, un délai typique de 3 ms est nécessaire, puis on moyenne la position de la touffe ciliaire sur une durée du même ordre de grandeur, ce qui donne une mesure de position de la touffe ciliaire X_i pour la marche i . Le même traitement est effectué sur la force $F(t)$, et l'on obtient pour une marche le couple (X_i, F_i) . Cette procédure est répétée pour chaque marche Δ_i de la série avec les mêmes délais et durée de moyennage, et l'on obtient au final la courbe force/déplacement caractéristique de la touffe ciliaire.

La gamme des déflexions X_i est choisie pour couvrir la zone non linéaire de la touffe ciliaire, et les points (X, F) sont ajustés dans le cadre du modèle simple présenté en I.F par l'équation

$$F = K_\infty X - NZ P_o + F_o$$

avec

$$P_o = \frac{1}{1 + \exp(-Z(X - X_0)/k_B T)}$$

ce qui donne accès à K_∞ , N , Z et X_0 la position du centre de la zone non linéaire dans le repère F, X (Figure II-21.A). Les valeurs de k_{GS} et d sont déduites de K_∞ , N , Z , et de la connaissance de K_{SP} (prise égale à 0,2 pN/nm) par $K_{GS} = K_\infty - K_{SP}$, $k_{GS} = K_{GS}/(N \gamma^2)$ et $d = Z/(\gamma k_{GS})$. Cet ajustement permet également de déterminer la probabilité d'ouverture des canaux dans le cadre du modèle à deux états : la connaissance de Z et X_0 permet d'obtenir la forme de P_o .

C.2.2. Mesures en déplacement imposé

La mesure d'une courbe force/déplacement en déplacement imposé est nécessaire lorsque la touffe ciliaire présente de la raideur négative dans cette caractéristique. En boucle ouverte, on ne peut pas mesurer cette raideur négative. La boucle de rétroaction décrite au paragraphe B.4 permet d'imposer la position de la touffe ciliaire et de faire des mesures de couples (X_i, F_i) même pour une cellule oscillante.

La procédure de mesure en boucle fermée est identique à celle en boucle ouverte (voir paragraphe précédent). Il est auparavant nécessaire de régler les gains du PID, pour qu'à chaque marche de commande Δ_i corresponde une marche de déplacement de la touffe ciliaire fidèle à la commande. Cette tâche est souvent difficile, de par les imperfections de la boucle de rétroaction, un couplage imparfait entre la fibre et le bulbe de la touffe ciliaire, et parce qu'il faut agir sur trois paramètres interdépendants que sont les gains P, I et D. En général, nous utilisons

la procédure suivante (en supposant que les constantes de temps τ_I , τ_D , τ_D' et τ_F sont réglés comme décrit au paragraphe B.4) : Une fibre est couplée à la touffe ciliaire, les trois gains P, I et D sont mis à zéro et les photodiodes sont centrées de manière à avoir un signal valant $X=0$. Une marche de commande est envoyée, en général dans le sens excitateur (ce qui permet de détecter les mauvais couplages de la fibre). Le gain I est augmenté, et on forme une marche grossière, avec un temps de montée important. Le gain P est ensuite augmenté, jusqu'à obtenir une marche plus abrupte, possédant un dépassement de commande après initiation de la marche (on est près de l'instabilité du PID). Ensuite, le gain D est ajusté jusqu'à faire disparaître ce dépassement. Le résultat est une marche de déplacement de la touffe ciliaire avec un temps de montée court (environ 1 ms) dans laquelle on ne distingue pas de cycle d'oscillation (Figure II-20). Le même réglage est appliqué pour chaque marche de la série, et la mesure est réalisée comme précédemment. On obtient au final une courbe dont un exemple est présenté figure II-21.A.

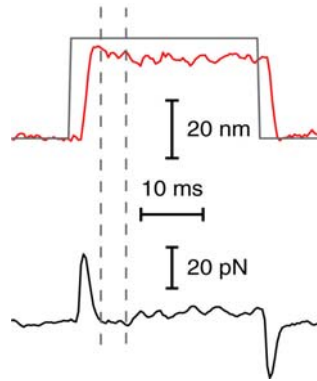


Figure II-20 : Exemple de stimulation d'une cellule oscillante en déplacement imposé. Haut : déplacements mesurés. Rouge : position de la touffe ciliaire. Gris : commande. Bas : force mesurée. Traits verticaux pointillés : intervalle de mesure.

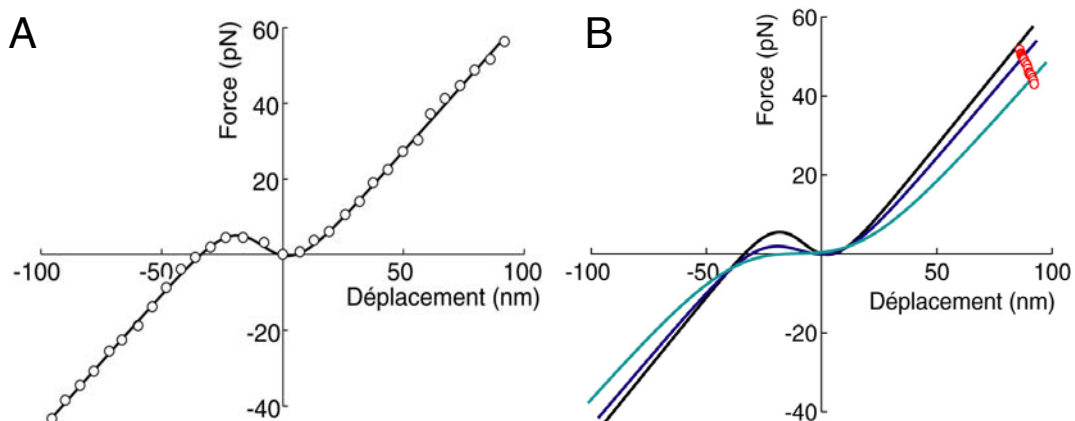


Figure II-21 : **A.** Exemple de mesure expérimentale d'une courbe F/X . Courbe noire : ajustement avec les paramètres $K_{\infty} = 0,718$ pN/nm ; $N = 64$; $Z = 0,53$ pN ; $X_0 = -8,4$ nm ; $F_0 = 25$ pN ; $P_0(X=0) = 75\%$. **B.** Évolution de

cette courbe lorsque l'on augmente le délai entre l'application du stimulus et la mesure. Courbe noire : 3,5 ms, bleue : 10 ms, turquoise : 23 ms. En rouge sont tracées les positions successives d'un point (X,F) lorsque le délai de mesure augmente. L'ordonnée et l'abscisse de ce point respectivement décroisse et croisse de façon monotone, reflétant la relaxation mécanique de l'adaptation.

C.2.3. Mesures et adaptation

Le phénomène d'adaptation va venir contrarier l'acuité des valeurs mesurées. Ces mesures sont réalisées en mesurant la force nécessaire pour obtenir des déplacements, mais l'adaptation va venir relaxer cette force aussitôt la déflexion appliquée. Pour que la mesure des couples (X,F) soit valide, il faut l'effectuer avant que ce processus n'agisse, donc le plus tôt possible après l'application du déplacement. Cette mesure ne peut pas se faire immédiatement : il faut attendre que le pic visqueux dans la dynamique de la force disparaisse ; classiquement, nos mesures sont faites 2 à 3 ms après l'application du déplacement.

On peut quantifier l'effet de l'adaptation sur nos mesures par des simulations numériques : la réponse d'une cellule de caractéristiques connues à une expérience de déplacement imposé est simulée et ajustée par le même algorithme utilisé pour nos mesures. Les résultats sont présentés ci-dessus (Figure II-22.A et B ; voir aussi Figure II-21.B) ; la zone non linéaire a tendance à s'évaser lorsque on augmente le délai entre l'application de la marche et la mesure, ce qui conduit à sous-estimer K_∞ et Z , à surestimer N , et par là à sous-estimer k_{GS} et surestimer d . Ces erreurs dépendent grandement de la vitesse d'adaptation et ne sont pas négligeables.

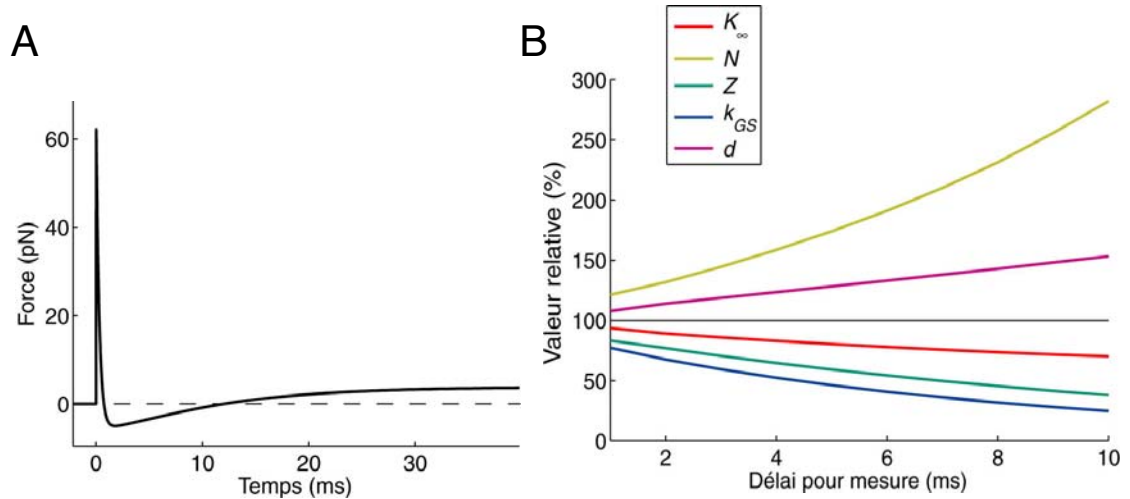


Figure II-22 : Effet d'un délai entre l'application de la marche de déplacement et le moment de mesure sur les paramètres inférés par ajustement des courbes F/X . **A.** Simulation numérique de la force nécessaire pour imposer un déplacement de 7 nm, pour la cellule dont les paramètres sont reportés dans l'annexe G colonne A. Le pic visqueux dans la force, d'environ 1 ms ici, masque les valeurs négatives de la force générée lors de la transduction. Après quelques millisecondes, l'adaptation relaxe mécaniquement la touffe ciliaire, et l'on ne mesure plus de force négative. **B.** Valeur relative de grandeurs inférées par ajustement de l'équation 1.6, normalisées par leur valeur réelle, selon le délai entre l'application de la marche de déplacement et le moment de mesure. Pour la même simulation numérique que sur la figure A.

C.2.4. Adhésion de la fibre

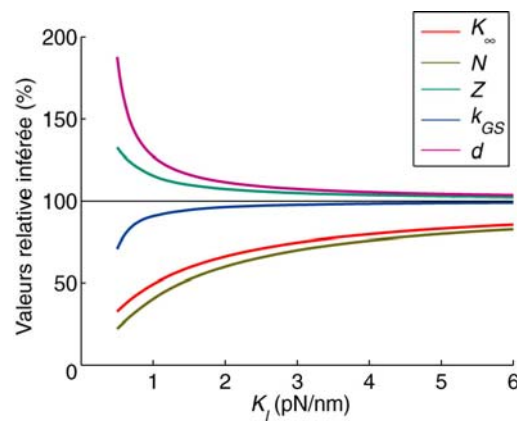


Figure II-23 : Effet d'un lien parasite entre le bulbe et la fibre sur les mesures mécaniques. Simulation numérique : valeurs inférées par ajustement et normalisées par rapport à la valeur réelle ($K_{\infty} = 1$ pN/nm, $N = 70$, $Z = 0,55$ pN, k_{GS} et d sont calculées avec $K_{SP} = 0,2$ pN/nm).

La mesure de la position de la touffe ciliaire à l'aide de fibres de verre repose sur une condition qu'il est capital de réaliser : il faut que la fibre et le bulbe du kinocil auquel elle est liée soient rigidement couplés. Si ce n'est pas le cas toute mesure est corrompue, puisqu'on mesure la position de la fibre qu'on ne peut plus assimiler à celle de la touffe ciliaire. On peut avoir une idée de l'influence de ce problème, en supposant qu'il se modélise par un lien souple de raideur K_l qui se rajoute entre la fibre et le bulbe kinociliaire. La position de l'extrémité de la fibre X est différente de X_b , la position de la touffe ciliaire. Supposons qu'on exerce une force F sur l'extrémité de la fibre. Avec les mêmes notations qu'au premier chapitre, l'égalité des forces en ce point s'écrit

$$F + K_l(X_b - X) = 0$$

et au niveau du bulbe

$$K_l(X - X_b) - K_\infty X_b + N Z P_o(X_b) + F_0 = 0$$

Les mesures mécaniques consistent à mesurer les grandeurs de la touffe ciliaire K_∞ , N et Z par ajustement de la courbe force/déplacement. Pour les déflexions qui ouvrent ou ferment totalement les canaux, on a, à une constante près $X_b = X \times K_l / (K_l + K_\infty)$, et donc sur ces branches

$$F = K_\infty \frac{1}{1 + K_\infty / K_l} X$$

Cette dernière expression montre qu'une mesure de la caractéristique force/déplacement va dans ce cas amener à sous estimer la valeur de K_∞ d'autant plus que la valeur de K_l sera faible. Des simulations numériques prenant en compte la zone non linéaire et l'algorithme utilisé pour obtenir les caractéristiques mécaniques à partir de la mesure des couples (X, F) montrent que toute mesure faite en présence de ce lien parasite va donner des valeurs qui sous estiment K_∞ , le nombre de canaux N , et surestiment la force de transduction Z (Figure II-23).

C.3. Stimulation par iontophorèse avec biais de la position statique de la touffe ciliaire

Pour modifier de manière transitoire la concentration de calcium à proximité d'une touffe ciliaire, une micropipette remplie de chlorure de calcium ou d'un chélateur du calcium (dans nos expériences : ATP, TP) est utilisée. Sa pointe est maintenue dans le plan d'observation, indifféremment derrière ou devant le bulbe du kinocil, ou sur le côté de la touffe ciliaire. Dans cette configuration, on peut suivre son comportement par vidéo lors de l'expérience ; une analyse d'image permet, une fois calibré, de mesurer la distance entre l'extrémité de la micropipette et la touffe ciliaire. L'image vidéo permet en sus de corriger manuellement les

problèmes de dérive qui surviennent. D'autre part, on est sûr ainsi que la micropipette n'est pas imagée sur les photodiodes et ne vient pas altérer les mesures de position.

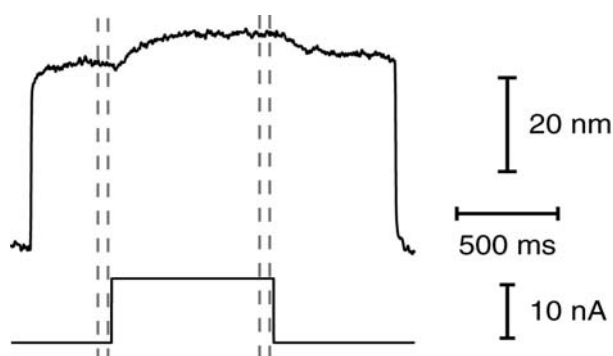


Figure II-24 : Exemple de mesure du mouvement induit par iontophorèse de CaCl_2 . Haut : position de la touffe ciliaire. Bas : courant de iontophorèse (courant de retenue : -2 nA , distance micropipette : $4 \mu\text{m}$). Traits verticaux : intervalles de mesure des positions

Le système de détection permet de mesurer le mouvement de la cellule en réponse à une stimulation par iontophorèse même lorsque la touffe ciliaire est laissée libre, mais dans la majeure partie des expériences, il est nécessaire d'imposer un biais à sa position initiale, ce qui ne peut se faire sans fibre. On couple alors une fibre souple à la touffe ciliaire par le bulbe, et un biais est imposé avant qu'une marche de courant de iontophorèse ne soit envoyée. Pour les très grands biais (supérieurs à 400 nm), la gamme des déplacements du stimulateur piézoélectrique peut être insuffisante. Dans ce cas, les biais sont appliqués grâce au micromanipulateur sur lequel est fixé l'élément piézoélectrique, et l'amplitude du biais est mesurée sur l'image vidéo. Pour de telles amplitudes, l'image de la fibre quitte les photodiodes, et il est nécessaire de recentrer celles-ci grâce à l'axe motorisé de la platine. Pour une gamme plus modeste de déplacements et avec une fibre suffisamment épaisse, on peut utiliser le stimulateur pour imposer les biais. Dans ce cas, chaque mesure est réalisée comme pour l'exemple présenté ci-dessus (Figure II-24) : Le biais est appliqué en déplaçant la base de la fibre et la touffe ciliaire répond par une déflexion reflétant la relaxation mécanique de l'adaptation. On laisse la touffe ciliaire adapter pendant environ 300 ms , en l'on mesure sa position juste avant d'éjecter du calcium ou l'un de ses chélateurs par iontophorèse. Cette position correspond au biais appliqué. Le courant d'éjection est envoyé pendant environ 1 s et la position de la touffe ciliaire est mesurée sur les 50 dernières millisecondes, avant de couper le courant de commande. Cette position, mesurée par rapport au biais précédent, est la réponse de la touffe ciliaire à la modification de son environnement ionique. On laisse l'excès d'ion diffuser pendant environ 500 ms avant de ramener la touffe ciliaire à sa position initiale, et l'on attend encore 200 ms avant de répéter la mesure.

C.4. Analyse des oscillations spontanées

Nous avons développé un algorithme simple permettant l'extraction des informations temporelles et spatiales de la forme des oscillations, et l'avons appliqué à des cellules oscillantes soumises à des concentrations de calcium variables. Le langage Matlab (*Matlab 7.0.1 – The Mathworks*) a été utilisé pour mettre au point un algorithme de détection des phases rapides des oscillations. Étant donnée une trace d'oscillations de touffe ciliaire, cet algorithme calcule sa dérivée temporelle, la moyenne sur une durée de l'ordre de $1/10^{\text{ème}}$ de période et détecte les maxima et minima de cette dérivée. Les instants obtenus sont ceux des sauts abrupts : dans le cadre de l'interprétation de cette classe de mouvements actifs exposée en I.F, en ces points la touffe ciliaire traverse la zone instable de raideur négative de sa caractéristique force/déplacement. Ces instants sont utilisés pour calculer T_o la moyenne de la période, t_+ la durée moyenne entre un saut positif et le saut négatif qui suit, et t_- la durée moyenne entre un saut négatif et le saut positif qui suit, sur un grand nombre de cycles. L'amplitude d'un saut abrupt est définie comme étant la différence des positions de la touffe ciliaire entre les instants où sa vitesse (moyennée sur quelques points) est divisée par un facteur constant (typiquement 2) par rapport à sa valeur maximale. Cette mesure est répétée pour chaque saut obtenu. Un exemple des traces obtenues est donné ci-dessous (Figure II-25).

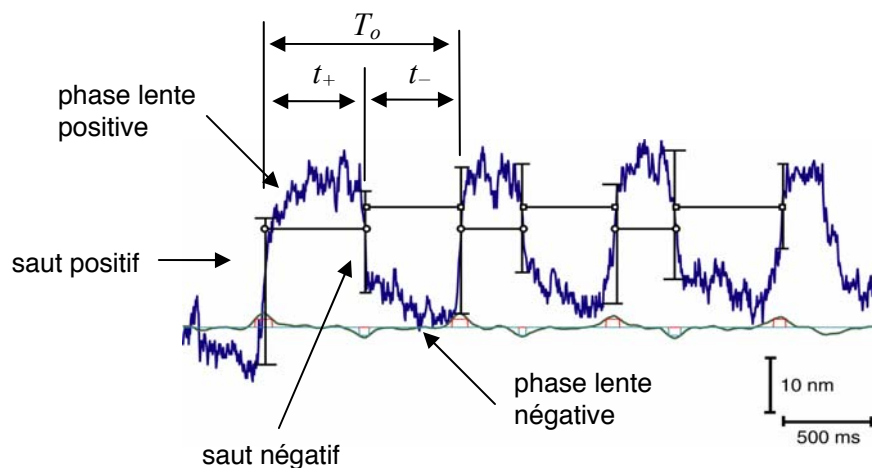


Figure II-25 : Exemple de mesure des caractéristiques des oscillations, obtenues sur une touffe ciliaire plongée dans de l'endolymphe NMDG. Bleu : trace non moyennée ; vert : dérivée moyennée ; rouge et turquoise : détection des sauts positifs et négatifs ; noir : mesure de l'amplitude des sauts abrupts et durée des demi-cycles.

Dans un premier temps, nous avons utilisé des simulations numériques pour valider cet algorithme et caractériser les artefacts qu'il peut introduire dans les mesures (voir l'annexe E). Les résultats de ces simulations indiquent qu'il faut

choisir des oscillations clairement biphasiques pour que les mesures soient pertinentes. Lors des expériences, une touffe ciliaire oscillante présentant des oscillations de relaxation bien marquées est choisie au sein d'un épithélium baignant dans de l'endolymphe NMDG. Une micropipette remplie de CaCl_2 est approchée, et pour des valeurs différentes du courant de iontophorèse, les oscillations sont enregistrées pendant une durée de l'ordre de 10 s en imageant la touffe ciliaire seule sur les photodiodes. Cette méthode permet d'obtenir une valeur moyennée sur le nombre de cycles enregistrés (20-200).

Les mesures sur l'amplitude nécessitent d'avoir une calibration de qualité constante pendant toute l'expérience. Or il est justement difficile de calibrer le signal en sortie des photodiodes pour une cellule oscillante, puisque ses oscillations vont introduire une grande variabilité d'une calibration à l'autre (pour la cellule de la figure III-10.A, la constante de calibration moyennée sur toutes les calibrations faites vaut $4,68 \pm 2,39$ mV/nm, $n=5$, moyenne \pm dispersion standard). Pour s'affranchir de ce problème, on normalise les mesures de l'amplitude. Pour chaque mesure on réalise d'abord une calibration du système photométrique. Les oscillations sont alors enregistrées, alors que la micropipette est soumise à son courant de retenue. Puis le courant de test est envoyé, et les oscillations sont à nouveau enregistrées, sans qu'une nouvelle calibration soit faite. La valeur de l'amplitude mesurée avec le courant test est ensuite normalisée par celle obtenue avec le courant de retenue, et ce pour chaque valeur du courant test.

Dans certains cas, une vérification supplémentaire est effectuée : après avoir fait la mesure pour le courant de test, on fait une troisième mesure (toujours avec la même calibration) en utilisant à nouveau le courant de retenue, et l'on s'assure que l'on retrouve les mêmes valeurs qu'avant l'envoi du courant test. Ceci permet de détecter les erreurs causées par une perte de la mise au point. Il faut en outre s'assurer que la dégradation de l'état de la cellule n'introduise pas de biais ; pour y pallier, on passe aléatoirement d'une valeur du courant à une autre.

D. Simulations numériques

Les équations I.13, I.14 et I.15 sont résolues numériquement en utilisant le logiciel de programmation Matlab (*Matlab 7.0, The MathWorks*). Lorsque les fluctuations ne sont pas prises en compte, le système est résolu par un algorithme de Runge-Kutta (ODE45) pour un ensemble de paramètres $\{K_{GS}, K_{SP}, K_{ES}, D, N, \lambda, \lambda_a, S, f_{\max}, T, \Delta\mu, \gamma\}$ donné, où $K_{GS}, K_{SP}, K_{ES}, D, N, \lambda, \lambda_a, S, f_{\max}$ ont la signification donnée dans les paragraphes I.D et I.E, T est la température et $\Delta\mu$ est la différence d'énergie libre intrinsèque du canal.

Chez la grenouille, les grandeurs mécaniques ($K_{GS}, K_{SP}, D, N, \Delta\mu$) sont contraintes par des mesures de relation F/X (voir le paragraphe I.E.2.2). Les paramètres λ et λ_a ont été précédemment évalués par des mesures de la dynamique

des mouvements ciliaires (voir I.D et I.E.3). Le facteur géométrique γ est donné par des mesures de la géométrie des touffes ciliaires. La gamme des valeurs utilisables pour simuler la dynamique des touffes ciliaires provenant du saccule de la grenouille taureau est donc limitée.

Paramètre	Gamme	Renvoi
K_{GS}	0,5 - 1 pN/nm	I.E.2.2
K_{SP}	0,2 pN/nm	I.E.1
N	30 - 100	I.E.2.2
D	25 - 60 nm	I.E.2.2
γ	0,143	I.C.5
λ	10^{-4} - $3 \cdot 10^{-3}$ pN.s/nm	I.E.3
λ_a	$2 \cdot 10^{-2}$ - $1 \cdot 10^{-2}$ pN.s/nm	I.D.5.3
$\Delta\mu$	$10 \times k_B T$	I.C.3

Tableau II-3 : Gammes des valeurs utilisées pour les paramètres mécaniques lors de la simulation de la dynamique d'une touffe ciliaire du saccule de la grenouille taureau.

Nous avons également réalisés des simulations stochastiques pour évaluer l'effet des fluctuations. Dans ce cas, deux sources de bruit η et η_a , gaussiennes et non corrélées sont ajoutées respectivement aux équations I.13 et I.14 [Nadrowski *et al*, 2004] :

$$\begin{cases} \lambda \dot{\bar{X}} = -K_{GS} (\bar{X} - \bar{X}_a - D P_o) - K_{SP} \bar{X} + F_{ext} + \eta \\ \lambda_a \dot{\bar{X}}_a = K_{GS} (\bar{X} - \bar{X}_a - D P_o) - K_{ES} (\bar{X}_a - \bar{X}_{ES}) + F_{max} (S P_o - 1) + \eta_a \end{cases}$$

avec les amplitudes de η et η_a choisies telles que

$$\begin{aligned} \langle \eta(t) \eta(0) \rangle &= 2 k_B T \lambda \delta_D(t) \\ \langle \eta_a(t) \eta_a(0) \rangle &= 2 k_B T_a \lambda_a \delta_D(t) \end{aligned}$$

où T est la température, k_B la constante de Boltzmann, λ la friction visqueuse, λ_a la pente de la relation force/vitesse du moteur d'adaptation, δ_D la distribution de Dirac et $T_a = 1,5 T$ [Nadrowski *et al*, 2004]. L'implémentation numérique du modèle, incluant des sources de bruit, s'est révélée capable de décrire extrêmement finement les oscillations spontanées des touffes ciliaires de la grenouille taureau [Nadrowski *et al*, 2004].

Nous avons étudié la réponse de ce modèle de la touffe ciliaire à une force extérieure F_{ext} dépendante du temps (sous forme d'échelons ou de fonctions sinusoïdales), et/ou à une variation $[Ca^{2+}]$. Une hypothèse forte du modèle est de supposer que la dynamique du calcium intracellulaire au niveau du moteur de l'adaptation est instantanée ; faire varier le calcium extracellulaire revient à faire à faire varier la force d'arrêt du moteur, *via* le paramètre S . Pour simuler un changement de $[Ca^{2+}]$ extracellulaire, la valeur de S est rendue dépendante du temps, sous la forme d'échelons, de fonctions sinusoïdales ou d'un profil temporel

reproduisant celui de la diffusion de calcium après iontophorèse. Dans toutes nos expériences, la force extérieure est appliquée au travers d'une fibre souple de raideur K_F . Son expression est alors $F_{ext} = K_F (\Delta - X)$ où Δ est la position de la base de la fibre. L'équation I.13 se réécrit alors

$$\begin{aligned} \lambda \dot{\bar{X}} &= -K_{GS} (\bar{X} - \bar{X}_a - DP_o) - K_{SP} \bar{X} + K_F (\bar{\Delta} - \bar{X}) \\ &= -K_{GS} (\bar{X} - \bar{X}_a - DP_o) - (K_{SP} + K_F) \bar{X} + K_F \bar{\Delta} \end{aligned}$$

On voit avec cette écriture que la dynamique d'une touffe ciliaire possédant une raideur des pivots K_{SP} et couplée à fibre de raideur K_F est la même que celle d'une touffe ciliaire possédant une raideur des pivots effectives $K_{SP}' = K_{SP} + K_F$ et soumise à une force $F_{ext}' = K_F \bar{\Delta}$. Dans nos simulations, les stimulations mécaniques sont codées de cette façon, et toutes les interprétations qui suivent y font appel. K_{SP} est la somme de la raideur des pivots et de la raideur de la fibre et c'est cette valeur qui est tabulée dans l'annexe G. Cette manière de traduire la dynamique d'une touffe ciliaire couplée à une fibre présente l'avantage d'être commode à implémenter, et de permettre l'analyse de la dynamique en réponse à une marche de déplacement de la base de la fibre en termes de force appliquée constante.

III. RESULTATS EXPERIMENTAUX

Au cours de ce travail de thèse, nous avons sacrifié 513 grenouilles (301 *Rana catesbeiana*, 212 *Rana esculenta*), étudiés 344 saccules et obtenus 235 cellules actives mécaniquement.

A. Mouvements actifs d'une touffe ciliaire

Une touffe ciliaire peut présenter des mouvements actifs, que nous avons ici répartis en 3 classes.

A.1. Oscillations spontanées

Des oscillations spontanées de la touffe ciliaire sont observées lorsque celles-ci baignent dans un milieu où la concentration de calcium est proche de celle rencontrée *in vivo* [Martin *et al*, 2003]. Des oscillations ont également été observées, mais plus rarement, lorsque les touffes ciliaires étaient plongées dans un

milieu où $[Ca^{2+}] = 4 \text{ mM}$ [Howard & Hudspeth, 1987], où dans un milieu à faible concentration de calcium $[Ca^{2+}] = 50\text{-}75 \text{ }\mu\text{M}$ (Tableau III-1).

	$[Ca^{2+}]$	# cellules oscillantes	# saccules contenant de telles cellules	# saccules étudiés
<i>Rana catesbeiana</i>	50-75 μM	5	4	10
	250 μM	181	106	229
	4 mM	6	6	34
<i>Rana esculenta</i>	250 μM	3	3	50
	4 mM	3	2	21

Tableau III-1 : Conditions expérimentales lors de l'observation de cellules oscillantes.

Comme observé précédemment [Martin *et al*, 2000], il est possible de mesurer sur une cellule qui exhibe ces oscillations une caractéristique F/X possédant une zone de raideur négative. Conformément au modèle présenté en I.F pour interpréter ces oscillations, l'origine du graphe, qui définit le point de fonctionnement de la cellule ciliée (voir I.G.2), est alors toujours contenue dans la zone instable de raideur négative.

Quand on peut définir une fréquence pour ces oscillations, celle-ci est dans la gamme 2-30 Hz et leur amplitude peut aller jusqu'à 100 nm crête à crête, lorsque les touffes ciliaires baignent dans un milieu où $[Ca^{2+}] = 250 \text{ }\mu\text{M}$. Ces oscillations lentes ressemblent à des oscillations de relaxation [Strogatz, 1997], pour lesquelles il est possible de définir deux composantes lors du mouvement de la touffe ciliaire : dans un demi-cycle d'oscillation, un mouvement lent est suivi d'un saut abrupt de polarité opposée (Figure III-1.A). À fort calcium ($[Ca^{2+}] = 4 \text{ mM}$), les quelques oscillations observées sont bruitées (Figure III-1.B) et dans la gamme 10-40 Hz. Lorsque l'on peut enregistrer sur une de ces cellules des oscillations et une caractéristique F/X , on remarque que cette dernière possède une région de raideur négative très peu marquée, quasi plate.

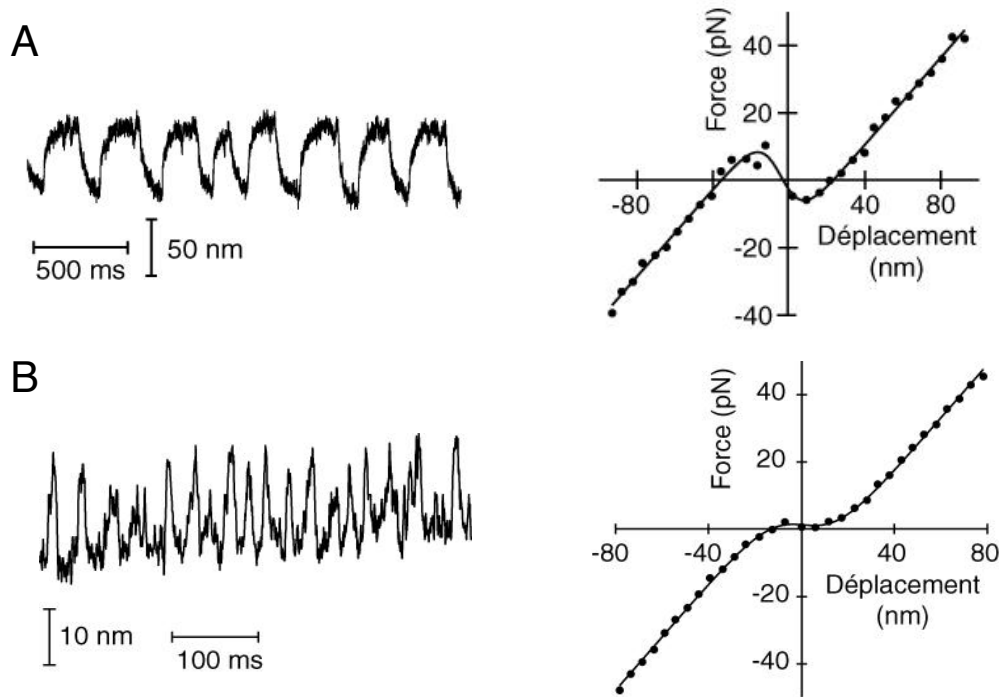


Figure III-1 : Oscillations spontanées de la touffe ciliaire d'une cellule ciliée et courbe F/X associée. **A.** Gauche : oscillations enregistrées en endolymph-NMDG sans fibre à la fréquence 12 Hz. Droite : courbe F/X mesurée sur cette même cellule, et ajustement par l'équation 1.6 avec les paramètres $K_{\infty}=0,648$ pN/nm, $N=56$, $Z=0,684$ pN, $X_0=-4,2$ nm, $F_0=23,3$ pN (fibre : $K_F = 0,750$ pN/nm, $\xi_F = 5,5 \cdot 10^{-5}$ pN.s/nm). **B.** Gauche : oscillations enregistrées en périlymphe sans fibre, dont le spectre est centré en $f = 32$ Hz avec une largeur à mi-hauteur de $\Delta f = 47$ Hz. Droite : Courbe F/X mesurée sur la même cellule et ajustement par l'équation 1.6 avec les paramètres $K_{\infty}=0,791$ pN/nm, $N=66$, $Z=0,453$ pN, $X_0=1,0$ nm, $F_0=15,3$ pN (fibre : $K_F = 0,302$ pN/nm, $\xi_F = 7,2 \cdot 10^{-5}$ pN.s/nm).

A.2. « Twitches » en réponse à une stimulation positive

Lorsque leur touffe ciliaire est plongée dans un milieu où $[Ca^{2+}] = 4$ mM, les cellules ciliées ne présentent en général pas d'oscillations spontanées de leur touffes ciliaires. Ces cellules présentent parfois un comportement de type « excitable » : en réponse à un échelon de déplacement de la base de la fibre de stimulation, le mouvement de la touffe ciliaire est interrompu par un mouvement transitoire de polarité négative. Dans nos expériences, ce mouvement de recul est toujours observé en réponse à une stimulation positive et est appelé « twitch positif » [Benser *et al*, 1996 ; Howard & Hudspeth, 1988]. Ce mouvement actif qui s'oppose à la force extérieure peut être rapide, avec un temps caractéristique de quelques millisecondes.

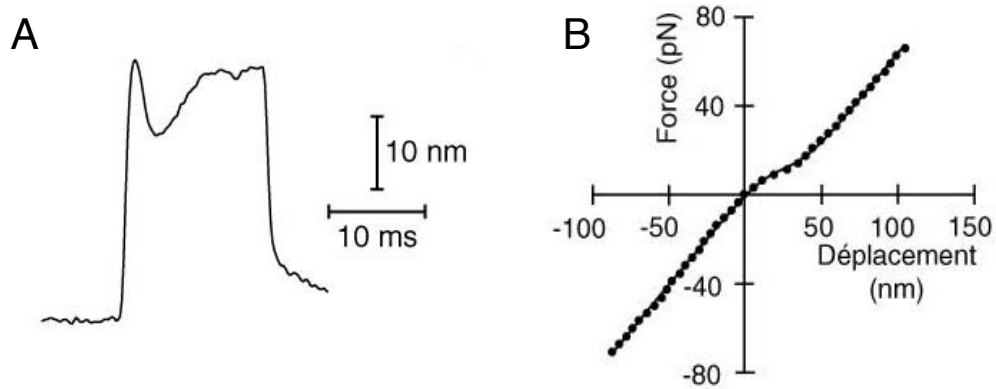


Figure III-2: Twitch positif mesuré en périlymphe et courbe F/X associée.

A. Défléchie par un stimulus positif, la touffe ciliaire exhibe un twitch de 10 nm d'amplitude sur 6 ms (fibre : $K_F = 0,271 \text{ pN/nm}$, $\xi_F = 1,03 \cdot 10^{-4} \text{ pN.s/nm}$, trace moyennée $20\times$). **B.** Courbe force/déplacement pour la même cellule. Ajustement par l'équation I.6 avec les paramètres $K_\infty = 0,829 \text{ pN/nm}$, $N = 50$, $Z = 0,41 \text{ pN}$, courbe centrée en $X_0 = 25 \text{ nm}$.

Il a été possible de mesurer du twitch en réponse à une déflexion positive sur 33 cellules provenant de 14 saccules. Du twitch positif a été mesuré en endolymph-NMDG sur une seule cellule (*Rana catesbeiana*, sur 184 saccules) ; un milieu où la concentration de calcium est élevée semble favoriser l'observation de ce type de comportement. De plus, ce comportement dynamique est corrélé à l'observation d'une région non-linéaire dans la caractéristique force/déplacement de la touffe ciliaire, centrée en déplacement X_0 positif par rapport au point de fonctionnement de la cellule (Figure III-2). Nous n'avons jamais mesuré de raideur négative pour une cellule présentant un twitch positif.

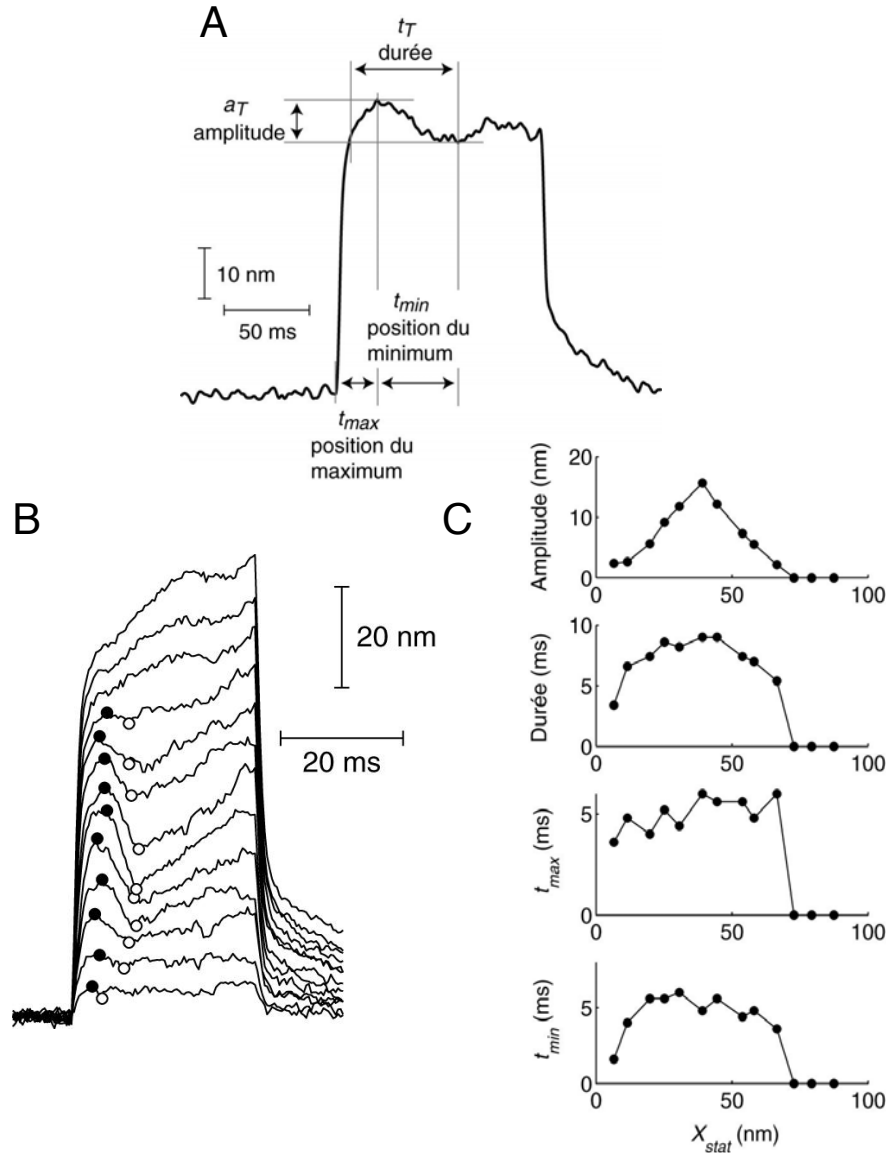


Figure III-3 : Évolution des caractéristiques du twitch avec l'amplitude de stimulation. **A.** Exemple de twitch lent et définition de la durée, de l'amplitude du twitch et de la position du maximum. Cette touffe ciliaire, oscillante en endolymphe-NMDG, et rendue quiescente par iontophorèse de CaCl_2 ($I=10$ nA au dessus du courant de retenue) répond à une déflexion positive par un twitch de 7 nm d'amplitude et durant 67 ms. **B.** Série de twitches obtenue sur une autre cellule pour des stimulations d'amplitude croissante. Cercles pleins : position du maximum local avant changement de polarité. Cercles clairs : position du minimum local (fibre : $K_F = 0,271$ pN/nm, $\xi_F = 1,03 \cdot 10^{-4}$ pN.s/nm, traces moyennées 10 fois). **C.** Amplitude, durée, position du maximum et du minimum mesurées sur ces traces, tracées en fonction de X_{stat} , position de la touffe ciliaire 3 ms avant la fin du stimulus.

Certains des twitches observés au court de ce travail de thèse ont une cinétique considérablement plus lente que celle publiée précédemment [Benser *et al*, 1996]. Les durées des twitches obtenus (définies sur la figure III-3.A) sont dans

la gamme 4-100 ms. Dans la gamme de déplacement pour lesquels il est observable, le twitch a une durée t_T qui dépend de l'amplitude de stimulation (Figure III-3.B et C) : celle-ci croît avec l'amplitude du twitch. Ce ralentissement est principalement dû à un mouvement de recul d'une durée t_{min} d'autant plus longue que son amplitude croît.

En mesurant précautionneusement les mouvements de 5 touffes ciliaires plongées dans de la périlymphe, nous sommes parvenus à mettre en évidence l'existence d'un seuil dans l'apparition du phénomène de twitch pour 2 d'entre elles (Figure III-4). Sur ces deux cellules, on n'observe un mouvement de recul dans la réponse de la touffe ciliaire que pour des déplacements de celle-ci de plus de 10 nm.

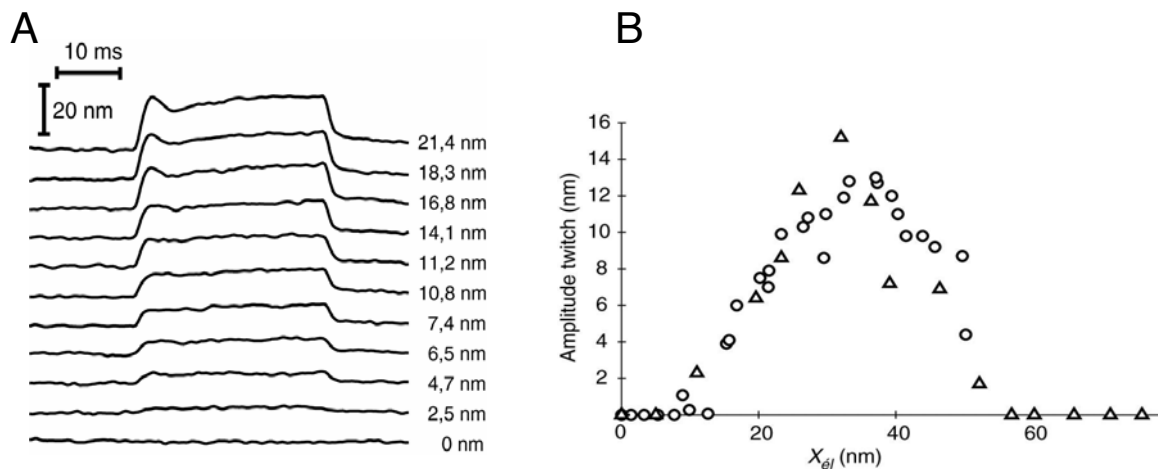


Figure III-4 : Existence d'un seuil de stimulation dans l'apparition du twitch.

A. Traces mesurées pour les 11 premiers point d'un ensemble de mesures, en fonction du déplacement élastique (déflexion de la touffe ciliaire 3 ms après l'initiation du stimulus, fibre : $K_F = 0,271$ pN/nm, $\xi_F = 1,03 \cdot 10^{-4}$ pN.s/nm, traces moyennées 10 fois, même cellule que la figure III-3). **B.** Amplitude du twitch mesuré pour deux ensembles de mesures (Δ et \circ). Ici, un twitch est mesurable seulement pour les déplacements supérieurs à 10 nm.

A.3. « Twitches négatifs » en réponse à une stimulation négative

Bien que plongées dans un milieu ionique dans lequel les oscillations spontanées sont observées le plus couramment ($[Ca^{2+}] = 250 \mu M$), une partie des touffes ciliaires étudiées n'oscillent pas spontanément. Certaines exhibent néanmoins un comportement « excitable » mais uniquement en réponse à un stimulus négatif, c'est-à-dire de polarité opposée à celle du twitch observé en milieu à fort calcium (voir A.2). Ces « twitches négatifs » ont été observés sur 4 cellules différentes en endolymph-NMDG. Ils se manifestent en réponse à un échelon

négatif de déplacement de la base de la fibre par un mouvement positif quelques millisecondes après l'initiation du stimulus (Figure III-5.A). Comme pour le twitch positif, il est possible de mesurer sur les cellules qui présentent ce comportement une région non-linéaire de pente faible dans la caractéristique F/X , mais celle-ci est cette fois centrée en un déplacement X_0 *négatif* par rapport au point de fonctionnement de la cellule (Figure III-5.B).

Le twitch négatif présente une polarité opposée et une cinétique plus lente que dans le cas du twitch positif (Figure III-5.C). Sur nos mesures, la durée d'un twitch négatif est toujours de plus de 15 ms même pour les petits stimuli, et varie peu avec leur amplitude. Le minimum apparaît lui d'autant plus tard que le stimulus est important.

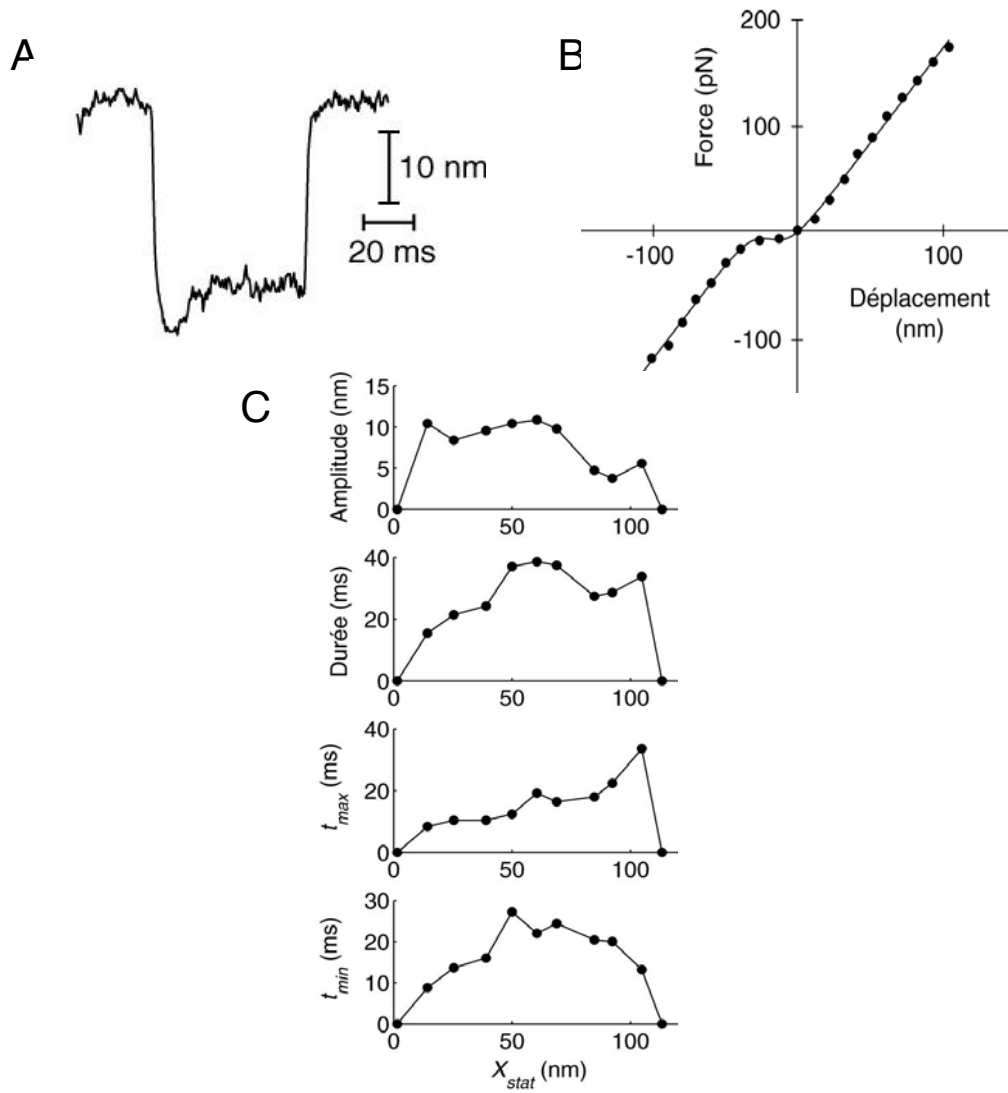


Figure III-5 : Exemple de twitch négatif observé sur une touffe ciliaire quiescente plongée dans de l'endolymphe NMDG. **A.** En réponse à une stimulation négative, cette cellule présente un mouvement de recul positif de 7 nm sur une durée de 21 ms (trace moyennée 5 fois). **B.** Courbe force/déplacement pour la même cellule. Ajustement avec les paramètres $K_{\infty}=1,99$ pN/nm, $N=165$, $Z=0,442$ pN, $X_0=-20,8$ nm, $F_0=68,0$ pN (fibre : $K_F = 0,739$ pN/nm, $\xi_F = 6,58.10^{-5}$ pN.s/nm). **C.** Amplitude, durée, position du maximum et du minimum du twitch négatif mesuré, en fonction du déplacement statique de la cellule (déflexion de la touffe ciliaire mesurée 3 ms avant la fin du stimulus).

B. Effets de Ca^{2+} sur la cinétique et l'amplitude des mouvements actifs

B.1. Effets sur le twitch positif

Les caractéristiques du twitch évoluent continûment avec le courant iontophorétique (Figure III-6). Avec la cellule oscillante de la figure III-11, la touffe ciliaire est d'abord rendue quiescente par un courant $I_{\text{CaCl}_2} \sim -5$ nA (courant de retenue : -10 nA), puis le courant de iontophorèse est graduellement augmenté. En réponse à une déflexion positive et avec $I_{\text{CaCl}_2} \sim -5$ nA, on observe un twitch très lent (100 ms) d'environ 10 nm (Figure III-6.A). Lorsque le courant de iontophorèse est augmenté jusqu'à 200 nA, la touffe ciliaire étant toujours soumise à la même stimulation, l'amplitude du twitch est divisée par deux, alors que sa durée passe d'environ 100 ms à moins de 9 ms (Figure III-6.B). Cette accélération se fait d'abord très rapidement (pour $I_{\text{CaCl}_2} = 20$ nA, cette durée n'est déjà plus que de 17,6 ms) puis plus lentement. La position du maximum t_{max} évolue comme la durée du twitch : on atteint ce maximum de plus en plus tôt lorsque l'on augmente la concentration de calcium. Le délai supplémentaire après lequel la touffe ciliaire atteint le minimum t_{min} (position du minimum) à la même dépendance en calcium : le mouvement de recul se fait de plus en plus rapide. La forme du twitch évolue également de manière continue d'un rebond lent et mou vers une dynamique plus abrupte (Figure III-6.A) qui se rapproche de celles publiées pour des cellules plongées dans de la périlymphe [Benser *et al*, 1996].

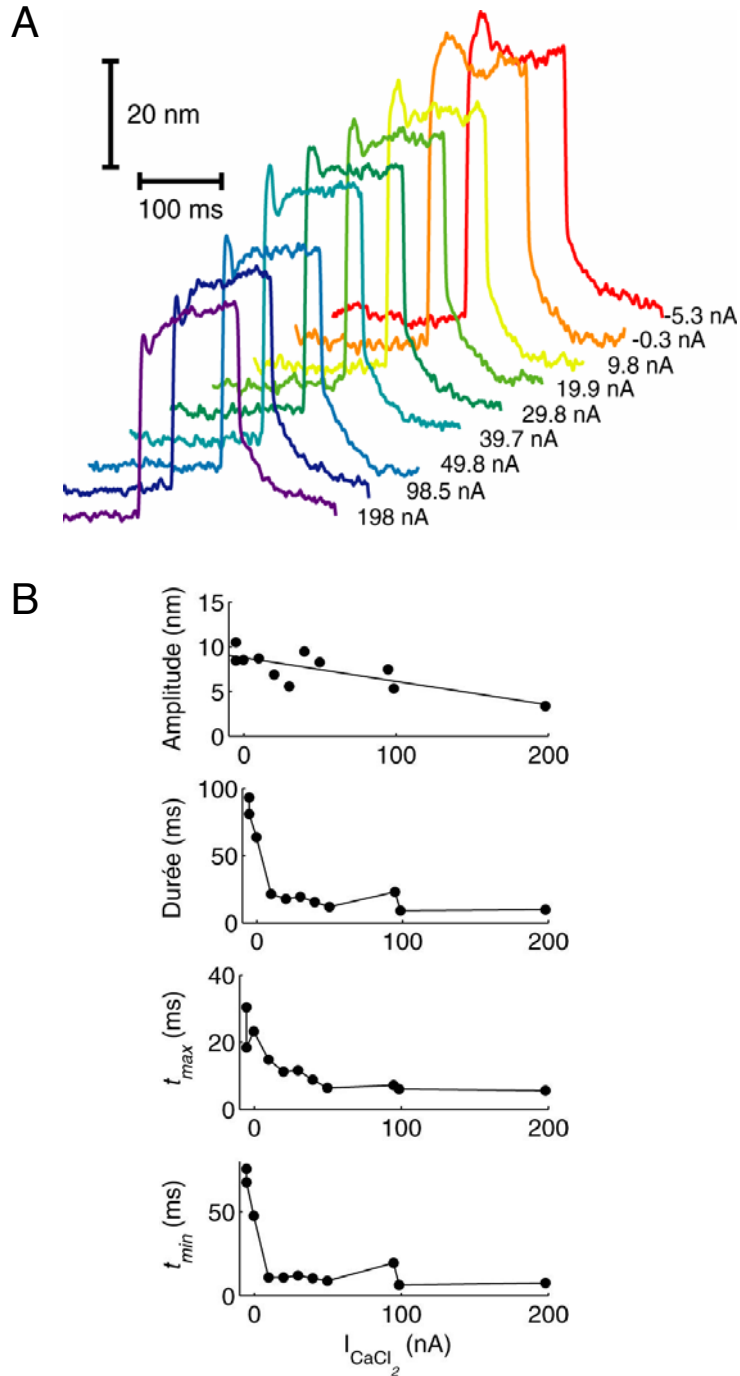


Figure III-6 : Effet du calcium sur la forme du twitch positif. **A.** Twitch mesuré pour une marche de déplacement de la base de la fibre identique (100 nm ; fibre : $K_F = 0,227$ pN/nm, $\xi_F = 6,1 \cdot 10^{-5}$ pN.s/nm ; trace moyennée 10 fois ; même cellule que sur la figure III-11 ; oscillante en endolympe-NMDG) en faisant varier $[Ca^{2+}]$ par iontophorèse de $CaCl_2$ (courant de retenue : -10 nA, micropipette à 3,7 μ m, gamme de $[Ca^{2+}]$ estimée : ~ 400 μ M - ~ 7 mM). **B.** Effet du calcium sur les caractéristiques du twitch positif. Amplitude, durée, position du maximum et du minimum du twitch mesuré sur la même cellule. Sur le graphe des amplitudes, un ajustement par la droite $y = -0,026 \cdot x + 8,8$ a été ajouté.

B.2. Effets sur la forme des oscillations

Dans le modèle présenté au paragraphe I.F, les oscillations spontanées proviennent d'une instabilité oscillatoire du moteur de l'adaptation dont le point de fonctionnement se trouve dans une zone instable de raideur négative de la courbe F/X d'une touffe ciliaire. Particulièrement dans le cas d'une oscillation biphasique, la forme d'une oscillation spontanée est le reflet de la trajectoire du système autour de la zone instable de la courbe F/X (Figure I-21). L'analyse de la forme des oscillations, et la façon dont celle-ci change avec le calcium, donne donc des informations sur la dépendance en calcium des caractéristiques mécaniques de la touffe ciliaire. Cette approche, bien que moins directe, est beaucoup plus aisée expérimentalement que la mesure de courbes F/X (voir D.2).

Huit ensembles de données ont été collectés sur 5 cellules, en procédant comme décrit dans le paragraphe II.C.4, et uniquement en utilisant des micropipettes remplies de CaCl_2 . La mesure des effets du Ca^{2+} sur l'amplitude d'une oscillation nécessite de se donner une oscillation de référence, ici mesurée lorsque la touffe ciliaire est soumise au courant de retenue de la micropipette, ce qui a été le cas pour 6 ensembles provenant de 4 cellules différentes. L'analyse des données temporelles ne nécessite pas de normalisation par rapport à une référence.

Comme observé précédemment [Martin *et al*, 2003], lorsque du calcium est éjecté à proximité d'une touffe ciliaire oscillante, les oscillations s'accroissent et diminuent légèrement en amplitude pic-à-pic (Figure III-7). L'accélération de l'oscillation résulte principalement d'un raccourcissement de sa phase lente positive, ce qui conduit à un changement du rapport cyclique. Les paragraphes qui suivent s'attachent à quantifier ces changements.

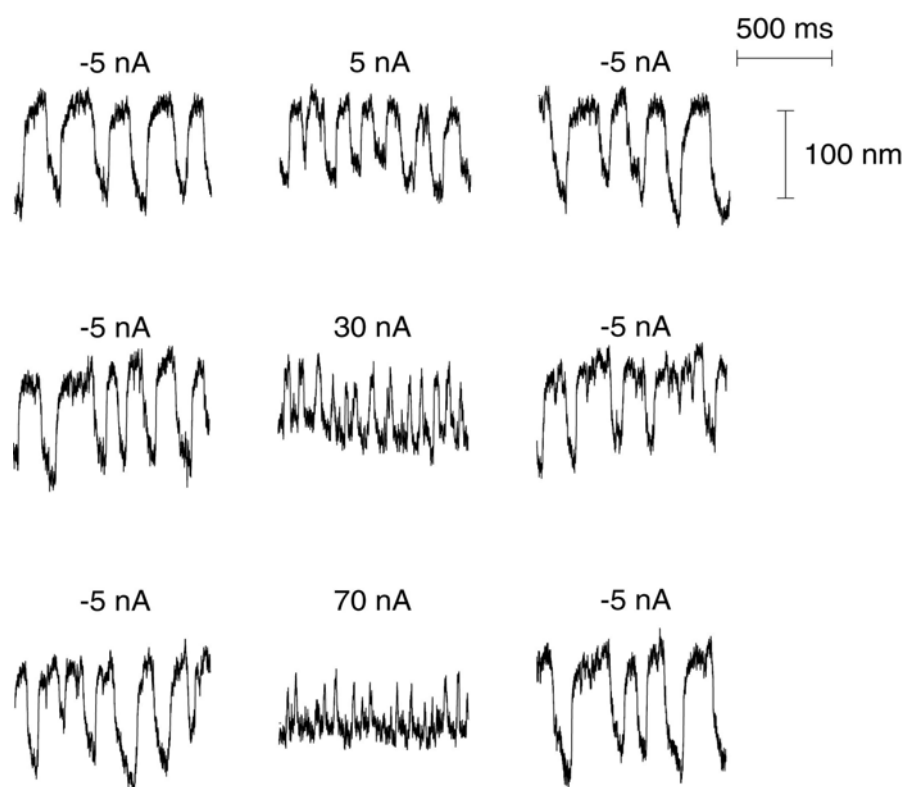


Figure III-7 : Effets du Ca^{2+} sur la forme d'une oscillation spontanée pour une même touffe ciliaire. Après avoir enregistré une oscillation de référence (gauche, courant de retenue : -5 nA , micropipette à $3,2 \mu\text{m}$, pendant 10 s), on applique un courant iontophorétique test (centre, **A.** 5 nA : $[\text{Ca}^{2+}] \approx 650 \text{ nM}$; **B.** 30 nA : $[\text{Ca}^{2+}] \approx 1,5 \text{ mM}$; **C.** 70 nA : $[\text{Ca}^{2+}] \approx 3 \text{ mM}$, pendant 10 s), puis on rétablit le courant de retenue (droite).

B.2.1. Analyse des informations temporelles

Pour chaque valeur du courant iontophorétique, nous avons mesuré la durée moyenne d'un demi-cycle positif ou négatif, la période moyenne, et le spectre de ces oscillations, dont l'ajustement par une fonction lorentzienne donne le pic central et la largeur à mi-hauteur. Dans tous les cas, l'augmentation de la concentration extracellulaire a pour conséquence d'augmenter la fréquence des oscillations et de les rendre moins bien définies. Ceci se manifeste par un spectre qui se décale vers les hautes fréquences en s'évasant (Figure III-8). Pour les grandes valeurs du courant d'éjection, le spectre est si bruité que l'ajustement par une lorentzienne perd son sens. Lorsque la fréquence des oscillations croît, le facteur de qualité Q du spectre (défini comme étant le rapport entre sa fréquence centrale et sa largeur à mi hauteur) varie en proportion approximativement inverse. Dans certains cas, il est possible de voir une saturation dans la dépendance en calcium : la fréquence (tant qu'on peut la définir) n'augmente plus au delà d'un certain courant, alors que le facteur de qualité continue de décroître.

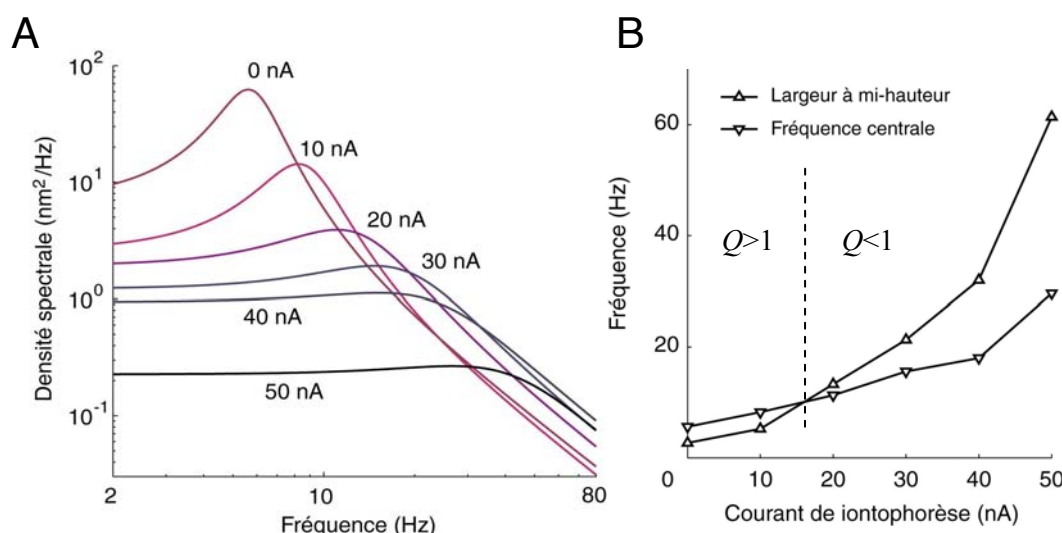


Figure III-8 : Effets du calcium sur le spectre des oscillations spontanées. **A.** Tracé de l'ajustement de chaque spectre par la fonction $I = A \times (1/(\Gamma^2 + (f-f_0)^2) + 1/(\Gamma^2 + (f+f_0)^2))$. Par soucis de clarté les données expérimentales sont masquées. **B.** Fréquence centrale et largeur à mi hauteur de chaque spectre en fonction du courant iontophorétique (courant de retenue : -6 nA, micropipette à 3 μm , le facteur de qualité Q de l'oscillation varie de 2,1 à 0,5).

L'analyse de la durée des demi-cycles (grâce à l'algorithme décrit dans le paragraphe II.C.4) révèle que l'augmentation de fréquence induite par le Ca^{2+} est principalement la conséquence d'une diminution de la durée de la phase lente positive des oscillations (Figure III-9.A). Les valeurs temporelles atteignent un plateau au delà d'une certaine valeur du courant iontophorétique (~40 nA pour les cellules de la figure III-9). L'analyse du spectre de ces oscillations révèle qu'au delà de cette valeur, la fréquence centrale n'évolue plus, mais le facteur de qualité continue à décroître (Q varie de 2,5 à 0,5). Pour toutes les cellules étudiées, la durée d'un demi-cycle positif t_+ est quasiment divisée par ~10 lorsque le courant de iontophorèse est augmenté jusqu'à 70 nA. La phase lente négative a en comparaison une durée qui varie peu (Figure III-9.A et D). En conséquence de quoi, la période est divisée par ~2 (Figure III-9.B et E).

On peut définir un rapport cyclique effectif en calculant le rapport entre la durée des demi-cycles positifs et la période totale d'un cycle (Figure III-9.C et F). Sa valeur pour le courant de retenue varie grandement d'une cellule à l'autre, mais pour toutes, ce rapport cyclique décroît de manière monotone avec le courant de iontophorèse jusqu'à une valeur saturante de $20 \pm 4\%$ (moyenne \pm déviation standard, $n = 6$).

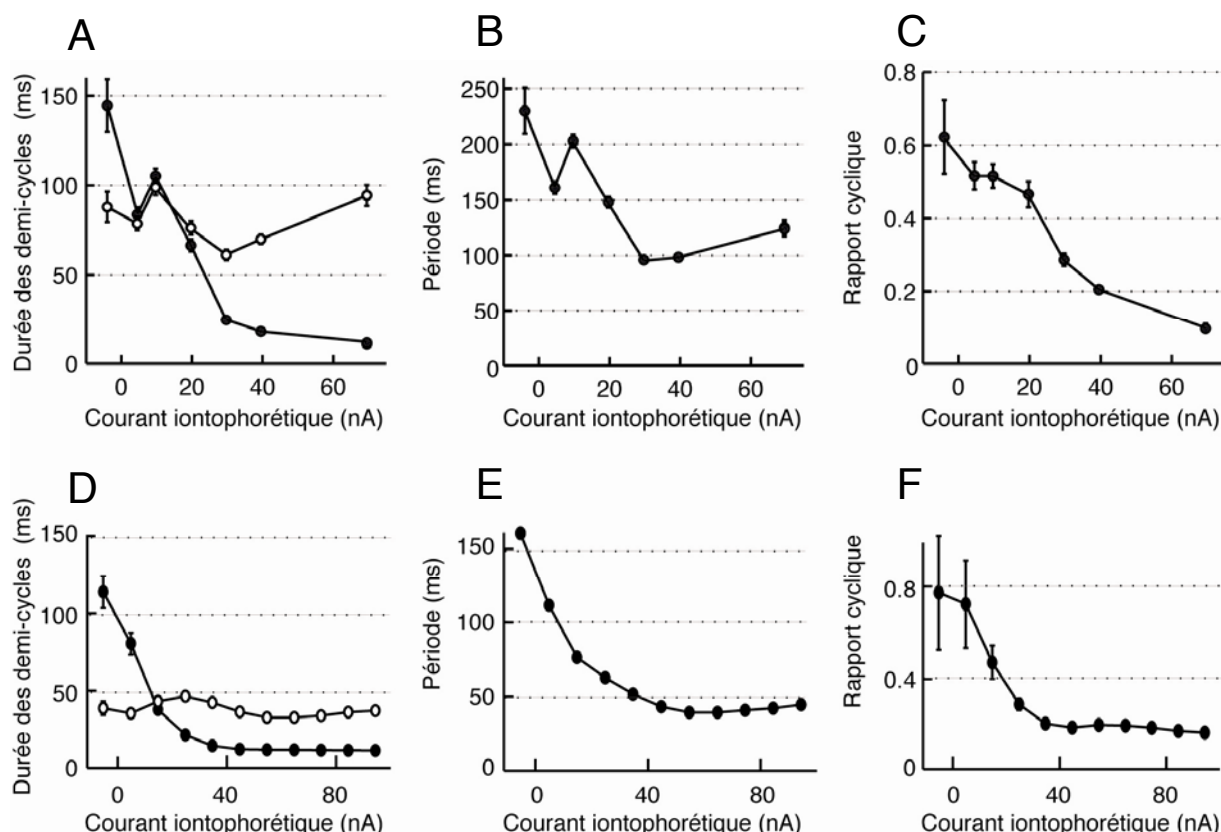


Figure III-9 : Effet du calcium sur les caractéristiques temporelles des oscillations spontanées sur deux cellules différentes. **A.** et **D.** : durée des demi-cycles positifs t_+ (●) et négatifs t_- (○). **B.** et **E.** : période des oscillations T_o . **C.** et **F.** : rapport cyclique effectif α , défini comme étant le rapport de la durée des demi-cycles positifs sur la période. (barres : moyenne \pm erreur standard ; le nombre d'événements pour chaque mesure varie de 41 à 150 ; courant de retenue : -5 nA ; **A,B** et **C** : cellule de la figure III-7).

B.2.2. Analyse des amplitudes

Dans le cadre de l'interprétation des oscillations spontanées présenté en I.F., et pour une oscillation biphasique, un saut abrupt correspond au moment où la trajectoire traverse la zone instable de raideur négative et passe d'une branche de la courbe F/X à l'autre (Figure I-21). On peut donc, en mesurant l'amplitude de ces sauts abrupts et leur dépendance en calcium, sonder la déformation de cette zone instable avec le calcium.

Pour cette expérience nous avons appliqué la procédure décrite au paragraphe II.C.4. Pour chaque mesure, nous avons normalisé l'amplitude des sauts abrupts de l'oscillation en présence d'un courant iontophorétique test par celle mesurée avant la stimulation sur l'oscillation de référence (obtenue avec le courant de retenue).

Nous avons vérifié que les effets du Ca^{2+} sur l'oscillation spontanée sont réversibles (Figure III-7).

Les variations des amplitudes des sauts abrupts sont nettement moins marquées que celles des grandeurs temporelles. Pour toutes les cellules étudiées, l'amplitude des sauts abrupts diminue (Figure III-10). Les sauts négatifs sont très peu affectés, avec une diminution de seulement $\sim 10\%$ qui dépend peu du courant iontophorétique test. Les sauts positifs sont plus affectés que les négatifs, mais la diminution d'amplitude n'excède pas 30 % de l'amplitude de référence. Cette diminution n'est pas un artefact introduit par l'algorithme de détection, puisque celui-ci a tendance à produire des amplitudes normalisées qui augmentent avec le Ca^{2+} (voir l'annexe E). Les valeurs données ci-dessus donnent donc une légère sous-estimation ($<10\%$) de la dépendance en calcium de l'amplitude normalisée de ces sauts. Les sauts positifs semblent avoir une amplitude plus grande que celle des sauts négatifs. On remarque que les sauts positifs pour le courant de retenue sont en moyenne plus grands que les sauts négatifs, 15 % dans le cas de la cellule de la figure III-10.D.

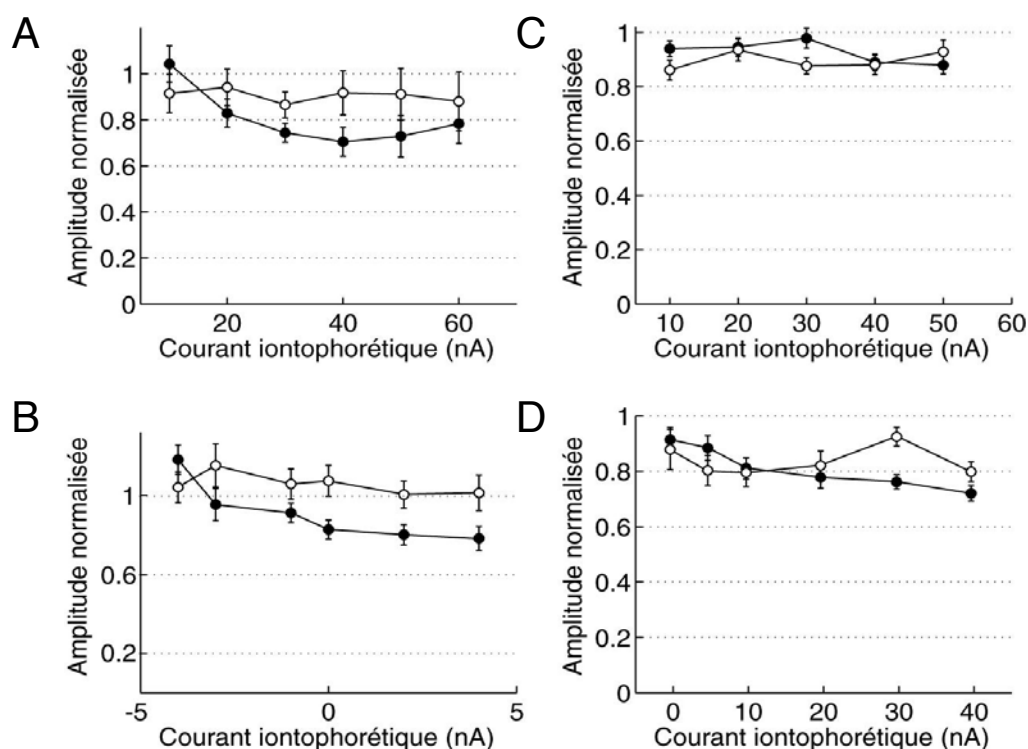


Figure III-10 : Dépendance en calcium de l'amplitude des sauts abrupts des oscillations pour quatre cellules différentes (amplitude normalisée par celle mesurée avec le courant de retenue). ● : sauts positifs ; ○ : sauts négatifs. **A.** Cellule de la figure III-7 et III-10.A, B et C. **B.** Cellule de la figure III-8. **C.** Courant de retenue : -10 nA, distance micropipette ~ 3 μm . **D.** Cellule de la figure III-9.D, E et F.

C. Changements de comportement dynamique

C.1. Changements de comportement dynamique induits par le calcium

En modifiant la concentration extracellulaire en calcium, localement par iontophorèse ou par échange des solutions, nous avons cherché à perturber le comportement dynamique d'une touffe ciliaire pour la faire passer d'une classe de mouvements actifs à une autre. Nous sommes parvenus à obtenir les 3 changements possibles.

C.1.1. Des oscillations spontanées au twitch positif

Lorsqu'une touffe ciliaire oscillante en endolympe-NMDG est soumise à une forte augmentation de la concentration en calcium extracellulaire, ses oscillations cessent. Dans la majeure partie des cas, il n'est pas possible de stopper les oscillations avec la gamme des courants de iontophorèse que permet chaque micropipette : celles-ci se bouchent avant d'atteindre le courant nécessaire. Nous sommes toutefois parvenus à induire du twitch positif sur 3 cellules oscillantes par iontophorèse de Ca^{2+} (Figure III-11). Sur celle de la figure ci-dessous, la touffe ciliaire non couplée à une fibre et non soumise à un courant de iontophorèse oscille de manière régulière et biphasique avec une amplitude d'environ 50 nm et à une fréquence de 17 Hz. Lorsque le courant de iontophorèse est augmenté de 5 nA par rapport au courant de retenue (qui était de -10 nA, micropipette à 3,7 μm), les oscillations cessent réversiblement. Pour un courant de 87 nA, la cellule répond à une déflexion positive par un twitch de 8 nm et de durée 9 ms. Dans les 100 ms qui suivent la déflexion, on n'observe pas de cycle d'oscillation.

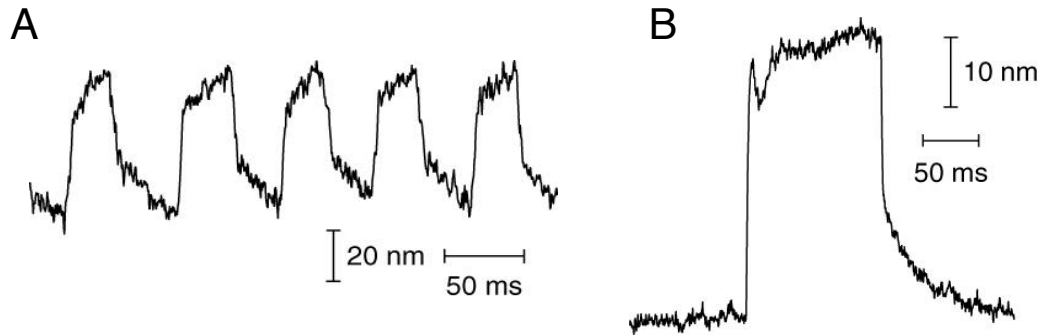


Figure III-11 : Passage d'un comportement oscillant à un comportement excitable de type twitch induit par iontophorèse de CaCl_2 en endolympe-NMDG. **A.** Oscillations spontanées d'une touffe ciliaire plongée dans de l'endolympe NMDG ($[\text{Ca}^{2+}] = 250 \mu\text{M}$). **B.** Cette même cellule présente du twitch en réponse à une déflexion positive lorsque l'on élève la concentration de calcium par iontophorèse ($I_{\text{CaCl}_2} = 87 \text{ nA}$, micropipette à $3,7 \mu\text{m}$, soit $[\text{Ca}^{2+}] \approx 3 \text{ mM}$; fibre : $K_F = 0,227 \text{ pN/nm}$, $\xi_F = 6,1 \cdot 10^{-5} \text{ pN.s/nm}$; trace moyennée 10 fois).

Inversement, il est possible de déclencher des oscillations sur une cellule ayant le comportement twitch et dont la touffe ciliaire baigne dans la périlymphe, en éjectant un chélateur du calcium (Figure III-12). La cellule de la figure ci-dessous exhibe le comportement twitch positif avec un rebond de 12 nm sur une durée $\sim 7 \text{ ms}$ dans un milieu où $[\text{Ca}^{2+}] = 4 \text{ mM}$. Lorsqu'une micropipette contenant du triphosphate est approchée et que ce chélateur du calcium est éjecté par un courant de iontophorèse de -5 nA par rapport au courant de retenue, des oscillations bruitées peuvent être mesurées.

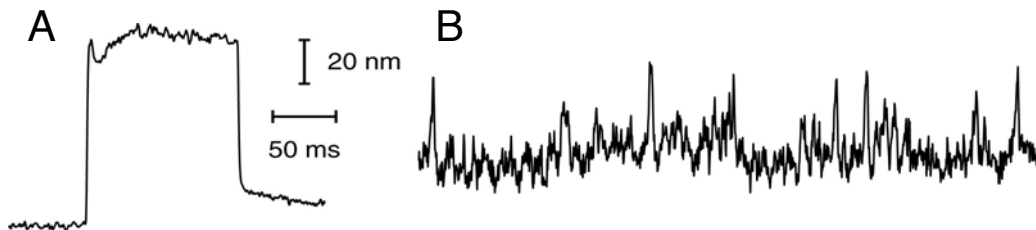


Figure III-12 : Passage d'un comportement twitch positif à un comportement oscillant induit par iontophorèse de triphosphate en périlymphe. **A.** Plongée dans la périlymphe ($[\text{Ca}^{2+}] = 4 \text{ mM}$), la touffe ciliaire de cette cellule répond à une déflexion positive par du twitch d'amplitude 10 nm et de durée 7 ms (fibre : $K_F = 0,301 \text{ pN/nm}$, $\xi_F = 7,2 \cdot 10^{-5} \text{ pN.s/nm}$, trace moyennée 10 fois). **B.** La même touffe ciliaire non couplée à une fibre donne des oscillations bruitées mesurable sans fibre une fois soumise à une iontophorèse de triphosphate (0 nA, courant de retenue : +5 nA).

C.1.2. Des oscillations spontanées au twitch négatif

Sur une des cellules présentant du twitch négatif, nous avons put induire des oscillations en éjectant du calcium par iontophorèse à proximité de la touffe ciliaire (Figure III-13). Lorsque le courant de retenue est appliqué à la micropipette, cette cellule reste quiescente, et répond à une déflexion négative par un twitch négatif d'amplitude 4 nm et s'étalant sur 38 ms. Une micropipette remplie de CaCl_2 est approchée, et un courant de +50 nA est envoyé. Au bout d'un temps de l'ordre de 100 ms, la cellule répond par un mouvement négatif lent, puis oscille avec une période de ~ 80 ms et une amplitude ~ 20 nm. Lorsque le courant est stoppé, les oscillations perdurent pendant encore ~ 200 ms puis s'arrêtent. Les deux comportements dynamiques oscillant et twitch négatif existent donc au sein d'une même cellule, et le calcium parvient à faire commuter la cellule de l'un à l'autre.

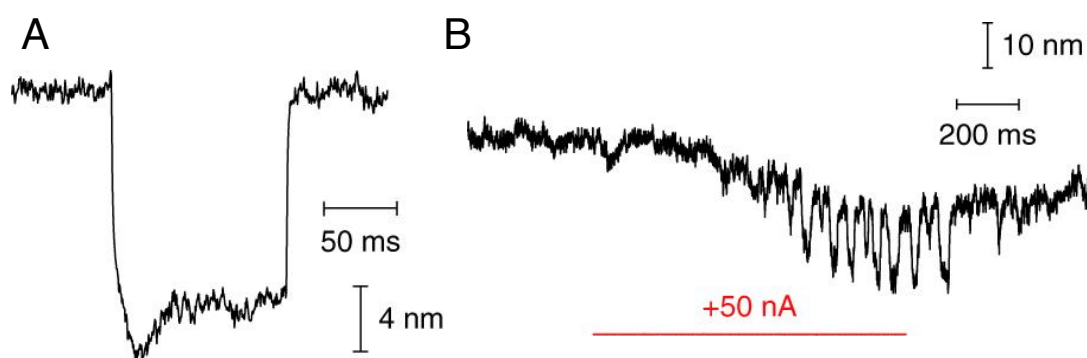


Figure III-13 : Passage d'un comportement twitch négatif à un comportement oscillant induit par iontophorèse de Ca^{2+} en endolymph-NMDG. **A.** Forme du twitch négatif observé sur une cellule dont la touffe ciliaire était plongée en endolymph NMDG ($[\text{Ca}^{2+}] = 250 \mu\text{M}$). Amplitude et durée : 4 nm sur 38 ms (fibre : $K_F = 0,362 \text{ pN/nm}$, $\xi_F = 6,8 \cdot 10^{-5} \text{ pN/nm}$, trace moyennée 20 fois). **B.** Il est possible d'induire sur cette même cellule des oscillations spontanées en augmentant $[\text{Ca}^{2+}]$ par iontophorèse ($I = 50 \text{ nA}$, micropipette à $\sim 5 \mu\text{m}$, soit $[\text{Ca}^{2+}] \approx 1,5 \text{ mM}$).

Sur la figure III-14.A est tracée la mesure d'une courbe F/X pour une cellule quiescente en endolymph NMDG. On observe que cette courbe possède une région de raideur négative, centrée en un déplacement négatif par rapport au point de fonctionnement de la cellule. Ce point est porté par une portion de pente positive de la courbe, et est donc stable.

Il a été possible d'induire des oscillations sur cette cellule en augmentant la concentration de calcium à proximité de sa touffe ciliaire (Figure III-14.B). La fibre est d'abord découplée de la touffe ciliaire et celle-ci est directement imagée sur les photodiodes. Une micropipette remplie de chlorure de calcium est approchée et le

courant iontophorétique est graduellement augmenté à partir du courant de retenue. La cellule reste quiescente jusqu'à ce qu'une certaine concentration de calcium soit atteinte (obtenue pour un courant iontophorétique de 5 nA en sus de sa valeur de retenue). Les oscillations apparaissent ensuite brutalement, et perdurent tant que le courant persiste. Elles se manifestent par une grande excursion négative (100 nm) par rapport à la ligne de base qui varie peu avec le courant iontophorétique, alors que leur fréquence est quasiment multipliée par 3 (de ~4 Hz à ~11 Hz) sur la gamme de courant testée (Figure III-14C).

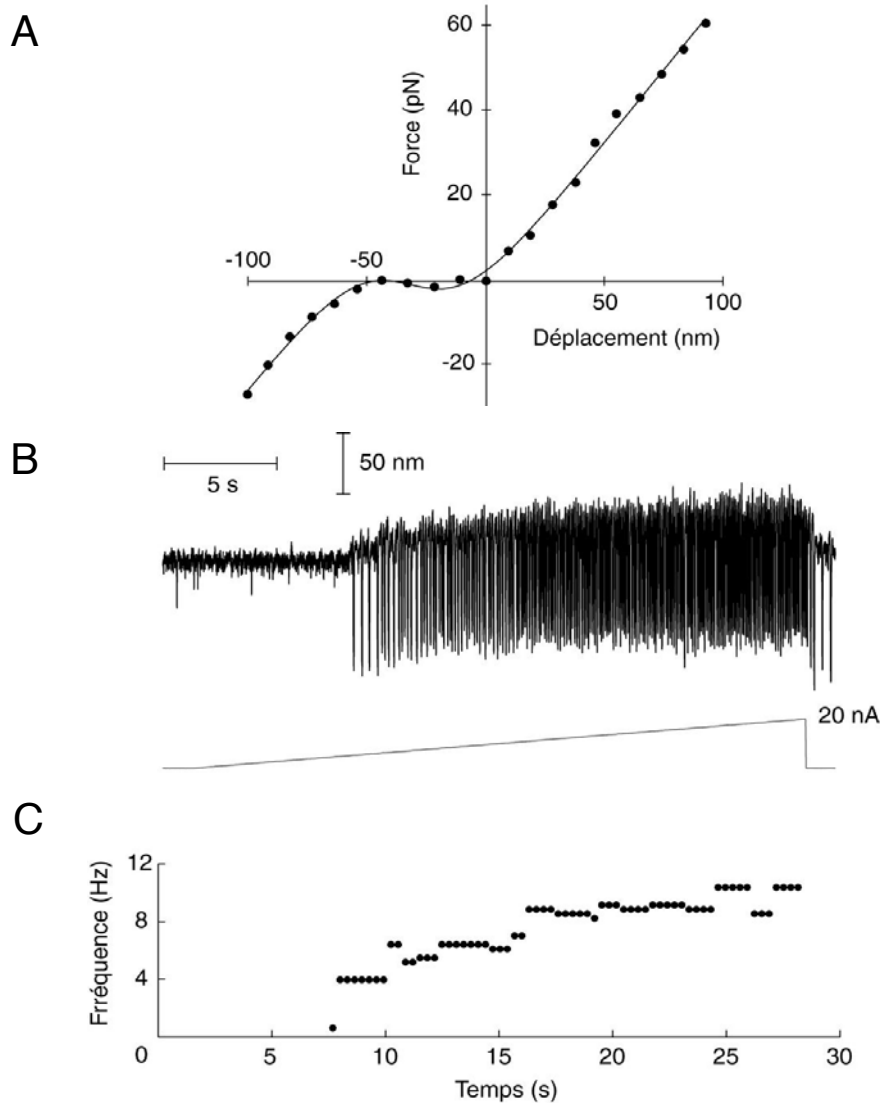


Figure III-14 : Oscillations induites par iontophorèse de Ca^{2+} . **A.** Courbe force/déplacement mesurée sur une cellule quiescente. Paramètres de l'ajustement : $K_{\infty} = 0,700 \text{ pN/nm}$; $N = 159$; $Z = 0,29 \text{ pN}$; $X_0 = -32 \text{ nm}$; $F_0 = 43,5 \text{ pN}$ (fibre : $K_F = 0,990 \text{ pN/nm}$, $\xi_F = 8,7 \cdot 10^{-5} \text{ pN/nm}$). **B.** Haut : mouvements de la touffe ciliaire enregistrés sans fibre. Bas : courant iontophorétique, micropipette à $4 \mu\text{m}$ de la touffe ciliaire (pour $I = 20 \text{ nA}$, $[\text{Ca}^{2+}] \approx 0,9 \text{ mM}$). **C.** Fréquence des oscillations déterminée par transformée de Fourier glissante.

C.1.3. Du twitch négatif au twitch positif

Enfin, les deux comportements excitables de polarités opposées ont été observés sur une même cellule. Plongée dans de l'endolymphe-NMDG, la cellule de la figure III-15 présente du twitch négatif, avec un rebond d'amplitude maximale 9 nm et de durée variant entre 15 et 42 ms (Figure III-15.A). La même cellule, plongée dans de la périlymphe après un changement de bain, a le comportement twitch positif, avec des rebonds d'amplitude maximale 6 nm, et des durées allant de 10 ms à 16 ms (Figure III-15.B). La courbe force/déplacement associée mesurée en endolymphe-NMDG montre que celle-ci possède une région non linéaire centrée en $X_0 = -21$ nm (Figure III-15.C). Les branches linéaires de cette courbe ont une pente de $K_\infty = 1,99$ pN/nm. En périlymphe, la mesure de cette caractéristique n'est pas assez précise pour qu'un ajustement par l'équation I.6 soit pertinent (Figure III-15.D). À l'œil, on distingue toutefois une région non linéaire, centrée en $X_0 \approx 10$ nm. L'ajustement des branches linéaires par une même droite donne une pente $K_\infty = 2,32$ pN/nm.

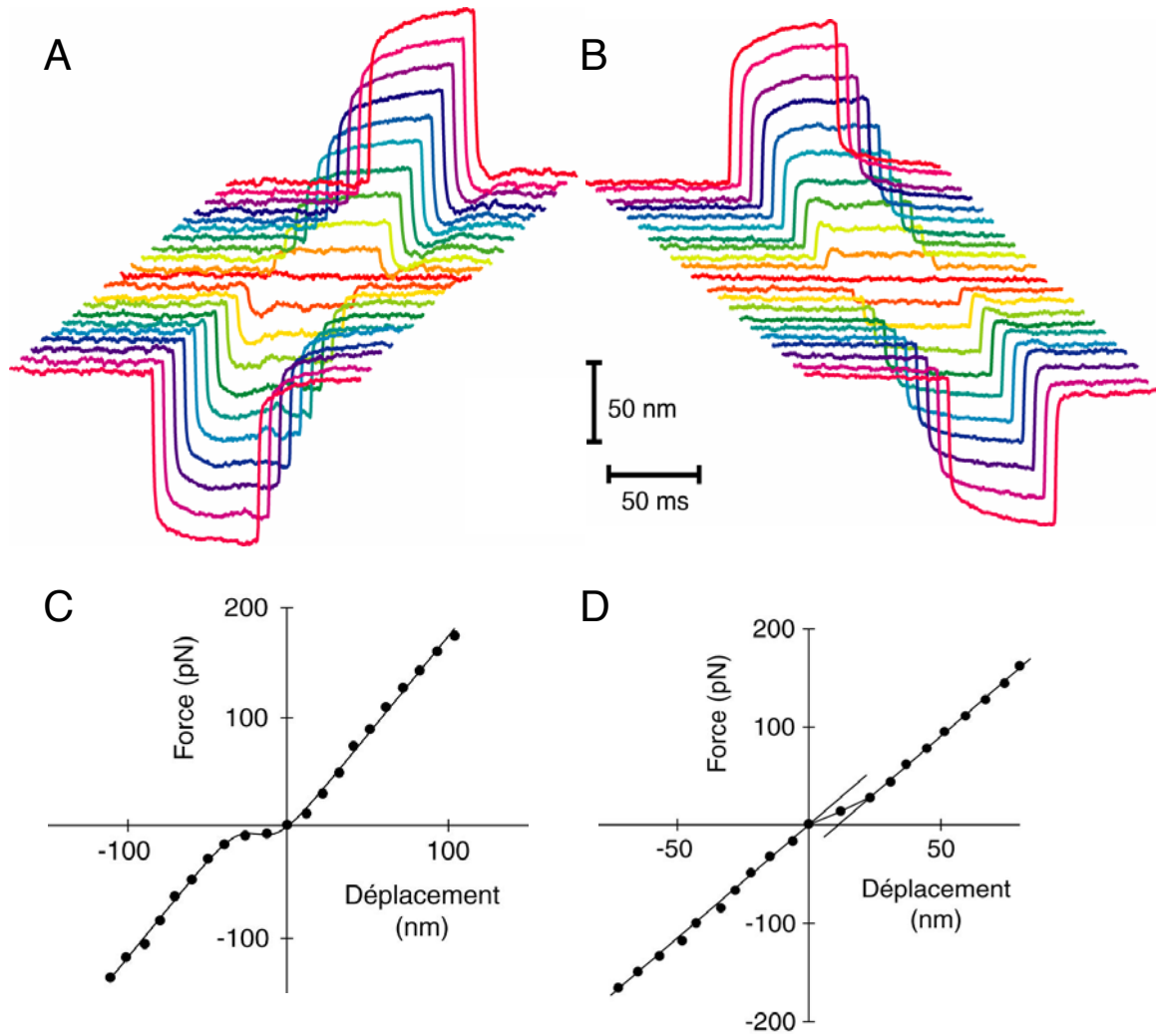


Figure III-15 : Passage d'un comportement twitch négatif observé en endolympe-NMDG à un comportement twitch positif en périlympe. **A.** Plongée dans de l'endolympe NMDG avec $[Ca^{2+}] = 250 \mu M$, cette touffe ciliaire exhibe le comportement twitch négatif (même cellule que sur la figure III-5, traces moyennées 5 fois). **B.** Plongée dans de la périlympe, elle présente du twitch positif (traces moyennées 7 fois). **C.** Courbe F/X mesurée dans l'endolympe NMDG et ajustement par l'équation 1.6 avec les paramètres $K_{\infty} = 1,99 \text{ pN/nm}$, $N = 165$, $Z = 0,442 \text{ pN}$, $X_0 = -20,8 \text{ nm}$, $F_0 = 68,0 \text{ pN}$. **D.** Courbe F/X mesurée en périlympe. Les deux branches linéaires ont une pente de $K_{\infty} = 2,32 \text{ pN/nm}$.

C.2. Changements de comportement dynamique induits par des déflexions statiques

Nous sommes parvenus également à induire des oscillations en modifiant transitoirement la position de 4 touffes ciliaires différentes, quiescentes en périlympe, et dont une provenait d'une *Rana esculenta* (Figure III-16). Pour l'une d'entre elles (Figure III-16.B), les oscillations sont précédées d'un twitch classique

se distinguant d'un cycle d'oscillation de par sa cinétique plus rapide (8 ms contre 80 ms pour les cycles d'oscillations qui suivent). Seules les déflexions positives parviennent à déclencher des oscillations, et seulement dans une certaine gamme (de 0 à 100 nm). Pour la cellule qui présente du twitch, l'observation d'un rebond était conjointe à celle d'oscillations et inversement : les deux phénomènes sont toujours simultanément présents ou absents.

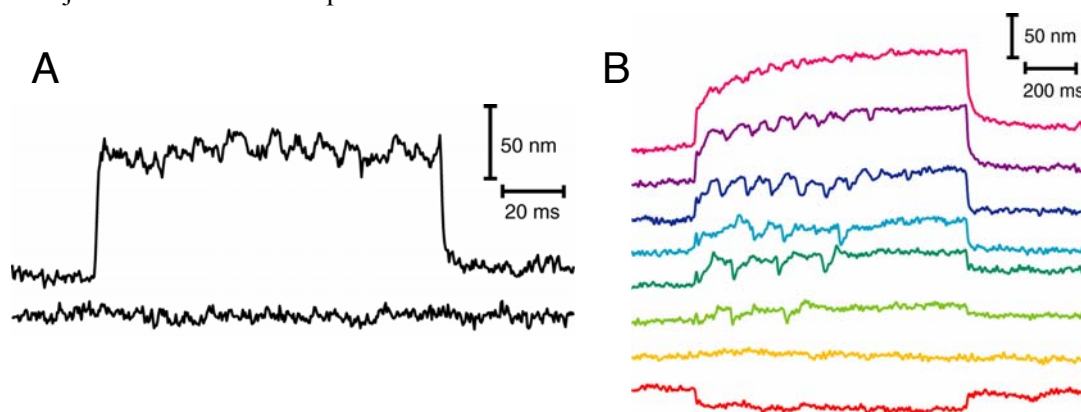


Figure III-16 : Oscillations induites par une déflexion positive statique pour des cellules dont la touffe ciliaire est plongée dans de la périlymphe. **A.** Sur cette cellule, les oscillations étaient bruitées et rapide (20 nm d'amplitude pour une période d'environ 10 ms). **B.** Sur cette cellule, les oscillations étaient précédées d'un twitch d'amplitude comparable à celle des oscillations.

De la même manière, il est possible d'induire des oscillations pour des cellules dont la probabilité d'ouverture au repos est trop élevée, en lui appliquant cette fois des déflexions statiques négatives. Nous y sommes parvenus sur de nombreuses cellules ; souvent, le simple fait de coupler sans ménagement une fibre au bulbe du kinocil d'une cellule quiescente déclenche l'apparition de quelques cycles d'oscillations. Un exemple de telles oscillations induites est donné ci-dessous (Figure III-17). Plongée en endolymphe-NMDG, la cellule étudiée donne pour des mouvements de la base de la fibre de l'ordre de 100 nm des oscillations d'environ 20 nm et d'une période d'approximativement 100 ms. La mesure de la caractéristique force/déplacement pour cette cellule n'a pas été réalisée en déplacement imposé, et ne possède pas une précision suffisante pour observer de la raideur négative dans cette caractéristique. On peut supposer néanmoins qu'elle possède en fait une région non linéaire centrée en une abscisse négative.

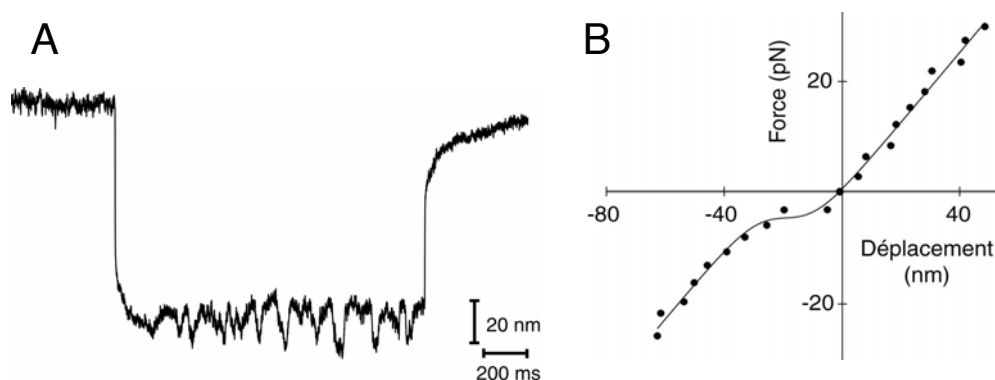


Figure III-17 : Oscillations induites par une déflexion négative statique pour des cellules dont la touffe ciliaire est plongée dans de l'endolymph-NMDG.

A. Oscillations induites par une déflexion statique négative de 100 nm sur une touffe ciliaire initialement quiescente en endolymph-NMDG. **B.** Courbes F/X mesurée sur la même cellule et ajustement par l'équation 1.6 avec les paramètres $K_{\infty}=0,633$ pN/nm, $N=25$, $Z=0,626$ pN, $X_0=-19$ nm, $F_0=15,2$ pN.

D. Effet de Ca^{2+} sur la caractéristique F/X d'une touffe ciliaire

D.1. Glissement des courbes F/X

Nous avons tenté de quantifier l'effet du calcium sur les touffes ciliaires non seulement par son action sur les différents comportements dynamiques qu'elles peuvent montrer, mais également par des mesures de leur caractéristique statique force/déplacement. Pour ce faire, une cellule est choisie au sein de l'épithélium et retenue pour les mesures ultérieures si ses caractéristiques mécaniques sont jugées suffisamment bonnes (existence d'une zone non linéaire dans la caractéristique F/X , raideur importante). On lui couple une fibre et une première mesure de la courbe force/déplacement est effectuée en présence d'une micropipette contenant du chlorure de calcium ou l'un des chélateurs du calcium, lorsque celle-ci est soumise à un courant de retenue suffisant pour ne pas perturber la cellule. Un courant iontophorétique est ensuite envoyé, et après un temps d'au moins une seconde, le système photométrique est réaligné avec la position au repos de la cellule (de telle manière à ce que l'origine du graphe soit toujours le point $X=0$, $F=0$). La boucle de rétroaction est ensuite ajustée et on lance la mesure. Ce protocole est répété pour plusieurs valeurs du courant iontophorétique, ce qui donne idéalement une courbe F/X pour chaque valeur de $[\text{Ca}^{2+}]$ testée.

Ces mesures se sont révélées particulièrement ardues à réaliser. L'obtention d'une de ces courbes nécessite un bon couplage entre la fibre et la touffe ciliaire, une rétroaction fonctionnant de manière efficace pour toute la gamme des

déplacements sondée et une absence de dérive pendant la mesure. L'obtention d'une série cohérente de ces courbes demande en sus de multiplier le temps de mesure, durée pendant laquelle il faut garantir que l'état de la cellule ne se dégrade pas, que le couplage fibre/kinocil reste identique, compenser la dérive qui survient, s'assurer que la micropipette reste à même distance de la touffe ciliaire et empêcher que celle-ci ne se bouche en capturant des impuretés. Bien que de nombreuses mesures aient été réalisées, un très petit nombre de celles-ci atteignaient les critères sus-cités ; toutes les autres ont été éliminées de l'analyse. Pour discriminer les séries cohérentes, nous nous assurons qu'une mesure était répétable en alternant entre la valeur du courant iontophorétique et celle de retenue.

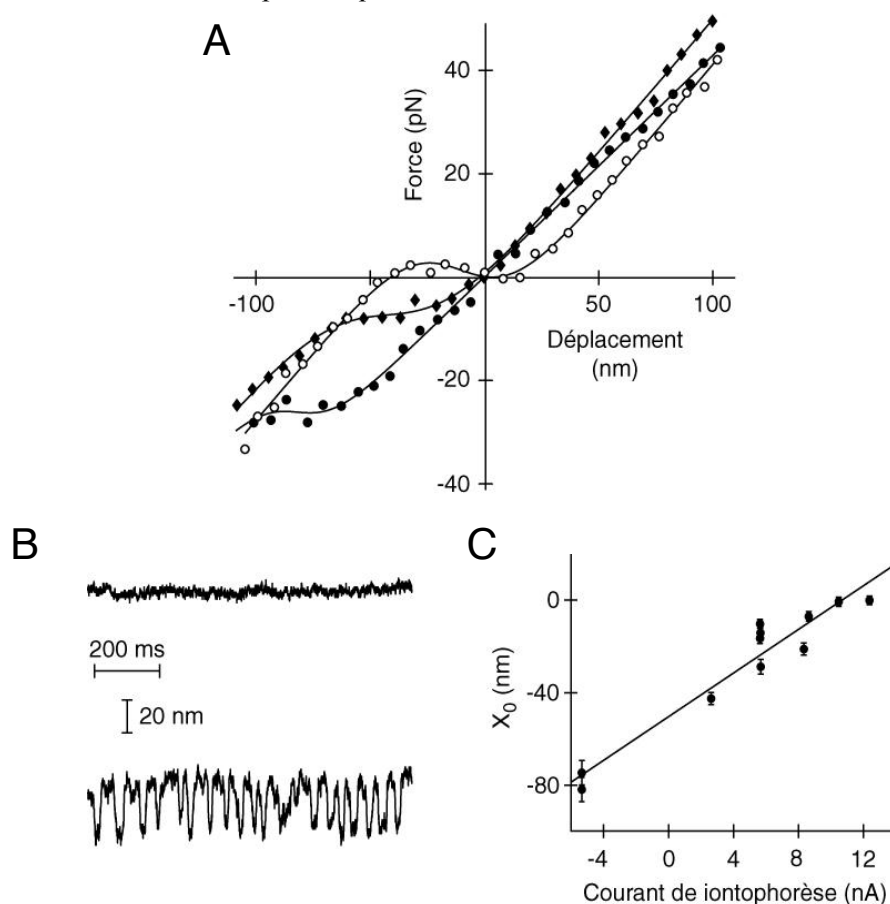


Figure III-18 : Glissement de la caractéristique F/X induit par une augmentation de $[Ca^{2+}]$. **A.** Trois des courbes force/déplacement mesurées en faisant varier le courant de iontophorèse de $CaCl_2$ (● : -5 nA, courant de retenue ; ◆ : 3 nA ; ○ : 6 nA ; distance micropipette : 2,5 μm ; fibre : $K_F=0,174$ pN/nm, $\xi_F=1,0 \cdot 10^{-4}$ pN.s/nm). **B.** Position du centre de la zone non linéaire en fonction du courant de iontophorèse ($CaCl_2$) pour cette même cellule. Barres d'erreur : intervalle de confiance à 90% pour l'ajustement. Droite noire : ajustement par $X_0(nm) = 4,72 \times \text{courant}(nA) - 50,4$ nm. **C.** Cette cellule est quiescente lorsqu'elle est soumise au courant de retenue mais oscille lorsqu'on la soumet à une iontophorèse de $CaCl_2$ (haut : -5 nA, courant de retenue ; bas : +5 nA).

Un exemple des résultats obtenus est présenté ci-dessus. Lorsque le courant iontophorétique de Ca^{2+} augmente, la région non-linéaire, initialement centrée en une abscisse X_0 très négative, se déplace vers les X positifs (Figure III-18.A). Le premier courant iontophorétique pour lequel la pente de la courbe F/X est négative au point $X=0, F=0$ est 6 nA. Pour un courant proche de cette valeur (5 nA), la cellule laissée libre oscille, alors qu'elle est quiescente pour des valeurs du courant inférieures (Figure III-18.B). De manière similaire, une autre cellule voit sa caractéristique F/X glisser vers les X négatifs lorsque l'on éjecte un chélateur du calcium (Figure III-19).

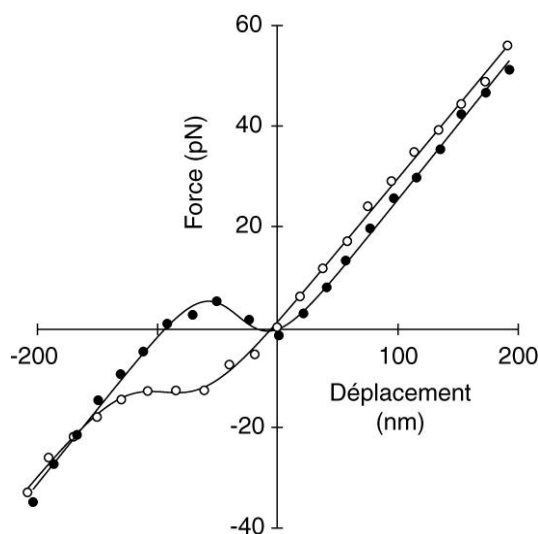


Figure III-19 : Glissement de la caractéristique F/X induit par une diminution de $[\text{Ca}^{2+}]$. Courbes F/X mesurées en présence d'un iontophorèse de triphosphate ; ● : +5 nA (courant de retenue) ; ○ : -20 nA. (Distance micropipette : $\sim 3 \mu\text{m}$; fibre : $K_F = 0,302 \text{ pN/nm}$, $\xi_F = 7,2 \text{ pN.s/nm}$).

Les mesures des caractéristiques F/X pour différentes concentrations de calcium donnent idéalement accès aux paramètres K_∞ , Z et N en plus de la position X_0 de la région non-linéaire, en ajustant ces courbes par l'équation I.6. On peut donc ainsi quantifier en principe comment les 3 grandeurs sus-citées dépendent du calcium. Malheureusement, il est très difficile d'obtenir des données exploitables. Lorsque la cellule présente une région de raideur négative, l'ajustement nécessite d'obtenir une très bonne précision pour les points au sein de la zone instable, et c'est particulièrement dans cette zone qu'il est difficile d'imposer la position de la touffe ciliaire au moyen de la boucle de rétroaction. À ceci s'ajoute des problèmes de répétabilité d'une mesure à l'autre : le couplage entre le bulbe et la fibre peut s'altérer au cours du temps, il est possible qu'un biais soit imposé à la touffe ciliaire, et l'état de la cellule se dégrade sur des temps longs, qui sont pourtant nécessaires à la mesure. Pour quasiment toutes les cellules étudiées, la dispersion des mesures de K_∞ , Z et N sur une même cellule excède la variation que l'on cherche à mettre en évidence. Toutefois, même si ce protocole se révèle délicat pour

la caractérisation de la forme des courbes F/X , il offre une bonne répétabilité sur la mesure de position X_0 , position du centre de la zone non linéaire. Cette grandeur correspond à la déflexion à appliquer pour obtenir une probabilité d'ouverture de 50%. Dans une gamme de déplacements pour laquelle la relation F/X est linéaire (correspondant à une probabilité d'ouverture des canaux $P_o \approx 1$), celle-ci dépend linéairement de la concentration en calcium (Figure III-18.C).

D.2. Déformation des courbes F/X

Comme signalé auparavant, il est particulièrement difficile de mesurer des courbes F/X avec une précision permettant de statuer sur leur déformation avec le calcium. Sur tout ce travail de thèse, nous ne sommes parvenus à obtenir des conditions où une variation des paramètres avec le calcium est mise en évidence de manière certaine que sur une seule cellule et pour deux concentrations de calcium différentes. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (Figure III-20).

Une cellule dont la touffe ciliaire (plongée dans de l'endolymphe NMDG) oscille est choisie, et une micropipette emplie de CaCl_2 est approchée à environ 3 μm . Le courant de retenue nécessaire pour que les oscillations ne soient pas perturbées par la micropipette est de -17 nA dans ce cas. La cellule est ensuite couplée à une fibre, et une courbe force/déplacement est mesurée. La concentration de calcium est modifiée en choisissant comme courant de iontophorèse $+40 \text{ nA}$, et la procédure reproduite. Il a été possible d'enregistrer sur cette cellule 13 courbes force/déplacement différentes, en passant aléatoirement d'une valeur du courant à une autre. Sur ces 13 courbes, 3 ont été écartées de l'analyse : 1 pour laquelle le courant de iontophorèse est mal défini (la micropipette s'est bouchée lors de la mesure), 2 montrant que la touffe ciliaire était soumise à un biais important de sa position dû à un couplage sans soin. Il reste 5 courbes pour chacun des courants. L'ajustement de chacune d'elle permet d'obtenir une valeur moyenne pour les paramètres K_∞ , Z , N et X_0 selon le courant iontophorétique. Ces résultats sont donnés ci-dessous (Tableau III-2).

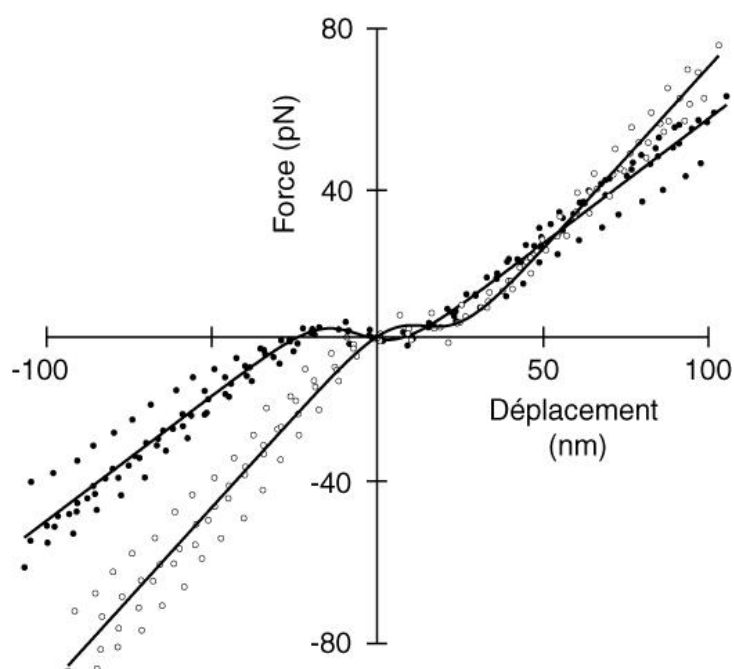


Figure III-20 : Courbes force/déplacement obtenues pour une même cellule et deux courants de iontophorèse de CaCl_2 : ● : points obtenus pour la valeur de courant de retenue (-17 nA) ; ○ : courant de 40 nA ($[\text{Ca}^{2+}] \approx 2,7 \text{ mM}$). Les courbes sont le tracé des ajustements par l'équation 1.6 obtenus pour tous les points de chaque valeur du courant.

	-17 nA (n=5) (moyenne \pm erreur std)	+40 nA (n=5) (moyenne \pm erreur std)
K_{∞} (pN/nm)	$0,655 \pm 0,024$	$0,992 \pm 0,045$
N	$50,0 \pm 10,4$	$52,4 \pm 3,6$
Z (pN)	$0,605 \pm 0,098$	$0,581 \pm 0,022$
X_0 (nm)	$-5,9 \pm 1,2$	$15,5 \pm 2,8$
k_{GS} (pN/nm)	$0,445 \pm 0,116$	$0,741 \pm 0,092$
d (nm)	$9,5 \pm 4,0$	$5,5 \pm 0,9$

Tableau III-2 : Valeurs des caractéristiques de la touffe ciliaire mesurées par ajustement de courbes force/déplacement. Pour le calcul de k_{GS} et d , K_{SP} a été pris constant et égal à $0,200 \text{ pN/nm}$.

La concentration de calcium atteinte en régime permanent lors d'une iontophorèse de chlorure de calcium par une micropipette à environ $3 \mu\text{m}$ de la touffe ciliaire et traversée par un courant d'environ 57 nA est de $\sim 2,7 \text{ mM}$. On note que le nombre N de complexes de transduction ne varie pas avec le calcium. La force de transduction Z ne varie pas non plus avec le calcium, en accord avec des mesures de courbes courant de transduction/déplacement publiées précédemment [Assad & Corey, 1992]. Le seul de ces 4 paramètres exhibant un changement important est la raideur totale K_{∞} de la touffe ciliaire qui voit sa valeur croître de moitié lorsque la concentration de calcium augmente. Cette différence est

significative et surpasse l'erreur standard estimée. Elle est en accord avec des mesures faites sur le poulet [Pae & Saunders, 1994], mais est en contradiction avec des mesures réalisées à l'aide d'une chambre expérimentale à un compartiment sur la grenouille [Marquis & Hudspeth, 1997]. On trouve une valeur de k_{GS} bien plus grande à fort calcium qu'à faible calcium, et conséquemment une valeur de d quasiment divisée par deux d'un courant à l'autre, quantitativement en accord avec les valeurs estimées en endolymph et en périlymphe par des méthodes similaires [Howard & Hudspeth, 1988 ; Martin *et al*, 2000].

Ces mesures ont été effectuées 2,5 ms après l'application du stimulus. On a signalé précédemment (section II.B.4) que ce délai conduisait à une erreur systématique sur les valeurs déduites, car le phénomène d'adaptation vient relaxer mécaniquement la touffe ciliaire après l'application d'une déflexion. Or à fort calcium, il a été rapporté que la dynamique de l'adaptation est plus rapide qu'à faible calcium (voir I.D.2). Comme nos mesures sont réalisées 2,5 ms après l'application du stimulus quelle que soit la concentration de calcium, il est possible des cinétiques d'adaptation différentes introduisent des erreurs différentes sur les mesures effectuées. Pour s'affranchir de cette possibilité, nous avons réalisé des mesures de courbes force/déplacement avec un délai variable, de manière similaire aux simulations numériques de la figure II-21.B. Les valeurs inférées sur ces courbes sont données ci-dessous (Figure III-21). Aux grands délais, les valeurs mesurées sont entachées d'une erreur trop importante pour être pertinentes, mais permettent de confirmer que les valeurs reportées dans le tableau III-2 ne sont pas corrompues par un artefact dû à un délai de mesure trop long. Si l'on extrapole ce qu'aurait donné une mesure avec un délai nul (ce que le pic visqueux dans la force rend impossible), on voit que les valeurs de d et k_{GS} seraient très proches de celles données plus haut.

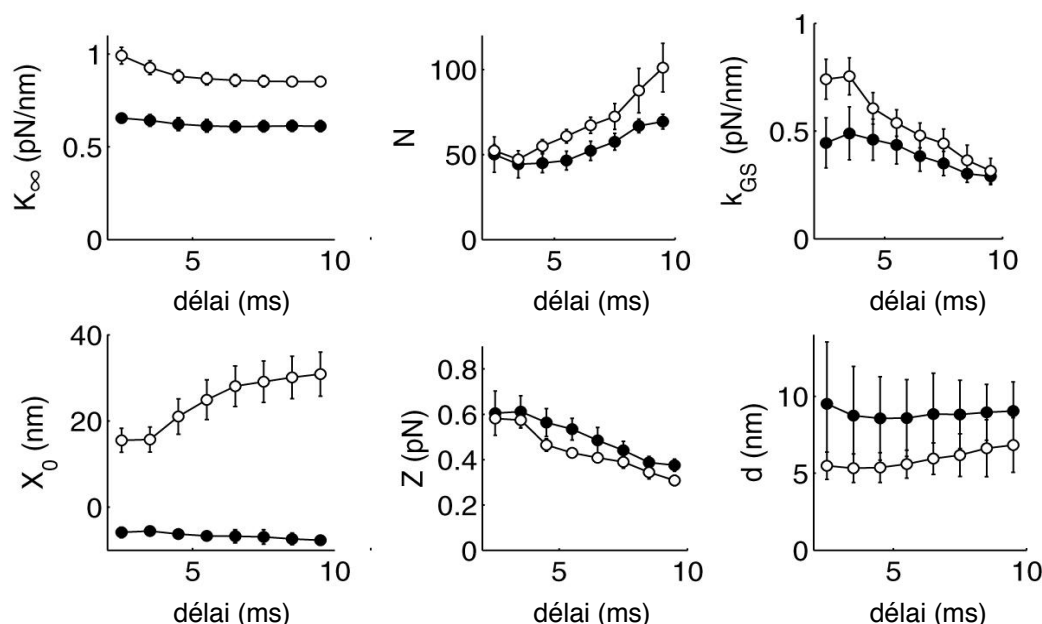


Figure III-21 : Valeurs des paramètres inférées par ajustement selon le délai attendu pour la mesure après l'application du stimulus (moyenne \pm erreur standard, $n=5$). \bullet : $I = -17$ nA ; \circ : $I = +40$ nA.

E. Mouvements ciliaires induits par un échelon de $[Ca^{2+}]$ en présence d'un biais statique

Nous avons montré dans le paragraphe D que l'effet principal d'un échelon de calcium sur une touffe ciliaire est de faire glisser sa caractéristique force/déplacement. Si la touffe ciliaire est libre de se mouvoir, nous nous attendons à observer en réponse à ce stimulus des mouvements ciliaires complexes qui reflètent la forme non linéaire de la courbe F/X associée. Le protocole de stimulation utilisé ici est décrit dans le paragraphe II.C.3.

E.1. Polarité et amplitude des mouvements observés

Pour cette étude, 96 cellules ont répondu à une iontophorèse de calcium ou de l'un de ses chélateurs en présentant un mouvement de leur touffe ciliaire. Plongée dans de l'endolymph-NMDG et non soumises à un biais, les touffes ciliaires répondent à une iontophorèse de Ca^{2+} par un mouvement net dans la gamme $[-35$ nm ; $+11$ nm] ($-13,8$ nm \pm 17,3 nm, moyenne \pm dispersion standard, $n=28$) ; 5 cellules sur 28 ont un mouvement positif, toutes les autres ont un mouvement négatif (Figure III-22.A et B). Pour une iontophorèse d'ATP ou de triphosphate dans les mêmes conditions (Figure III-22.C et D), le mouvement net mesuré est

dans la gamme $[-20 \text{ nm} ; +30 \text{ nm}]$ ($-1,2 \text{ nm} \pm 15,0 \text{ nm}$, moyenne \pm dispersion standard, $n=14$) ; 7 cellules sur 14 ont un mouvement de polarité négative (50%). Certaines réponses présentent une dynamique biphasique (Figure III-22.B) : une phase rapide est suivie d'une autre plus lente, qui peut être de polarité opposée.

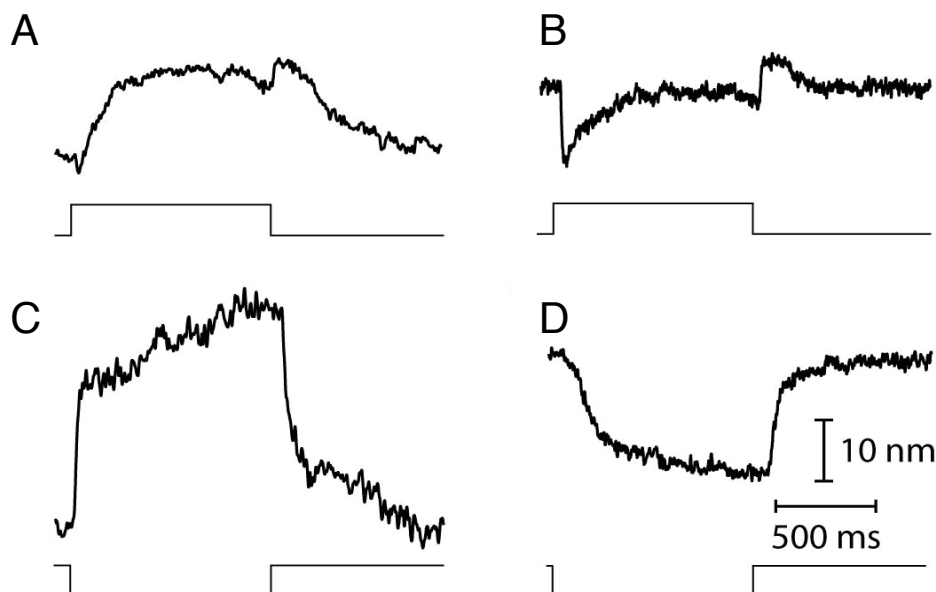


Figure III-22 : Mouvements induits par le calcium sur 4 touffes ciliaires différentes non biaisées et plongées dans de l'endolymphe NMDG. La forme du courant de iontophorèse est indiquée sous les traces. **A.** et **B.** en réponse à une iontophorèse de Ca^{2+} (50 nA ; distance micropipette : $\approx 3 \mu\text{m}$). **C.** et **D.** en réponse à une iontophorèse d'un chélateur du calcium (-50 nA ; ATP ; distance micropipette : $\approx 3 \mu\text{m}$). On peut distinguer deux phases dans le mouvement : une phase rapide où l'essentiel du déplacement se produit dans les premières 50-100 ms, suivie d'une phase plus lente qui peut être de polarité opposée à la première.

Si on applique un biais positif d'environ $1 \mu\text{m}$, les touffes ciliaires répondent à une augmentation de Ca^{2+} par un mouvement dans la gamme $[-100 \text{ nm} ; +10 \text{ nm}]$ ($-40,5 \text{ nm} \pm 34,4 \text{ nm}$, moyenne \pm dispersion standard, $n=23$). Nous n'avons observé des mouvements positifs que sur 2 cellules (sur 23 testées avec ce biais). Pour une iontophorèse d'ATP ou de triphosphate, le mouvement est dans la gamme $[-20 \text{ nm} ; +200 \text{ nm}]$ ($45,9 \text{ nm} \pm 57,7 \text{ nm}$, moyenne \pm dispersion standard, $n=18$). Pour cet ion, les mouvements négatifs deviennent rares : 2 cellules sur 18 seulement exhibent ce type de mouvement (11%).

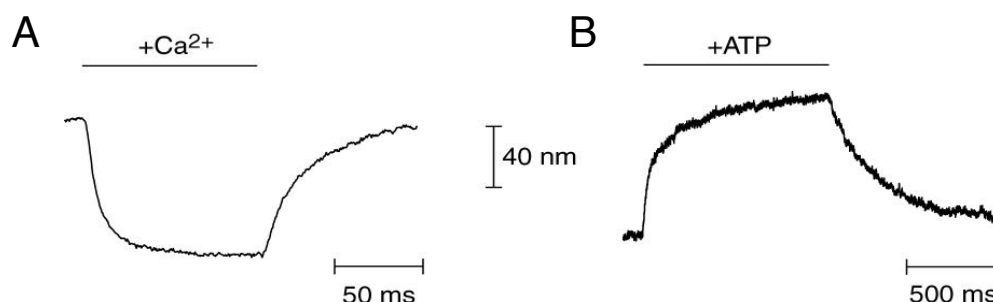


Figure III-23 : Exemples de mouvements observés pour deux cellules biaisées avec un offset $\sim 1 \mu m$, plongées dans de l'endolymphe NMDG, et soumises à un courant de iontophorèse. Gauche : $CaCl_2$, $+50 nA$ (fibre : $K_F=0,223 pN/nm$, $\xi_F=5,3 \cdot 10^{-5} pN.s/nm$; distance micropipette : $\sim 3 \mu m$) ; droite : ATP, $-50 nA$ (fibre : $K_F=0,500 pN/nm$, $\xi_F=2,2 \cdot 10^{-4} pN.s/nm$; distance micropipette : $\sim 3 \mu m$).

Ces mouvements ne sont pas observés si l'on utilise comme solution dans les micropipettes du chlorure de potassium, quelle que soit la polarité du courant. Nous avons également vérifié que ces mouvements et leur polarité ne dépendaient pas de la position de la micropipette par rapport à la touffe ciliaire. Ils ne sont pas non plus provoqués par un mouvement parasite de la fibre, puisqu'ils peuvent être observés lorsque la touffe ciliaire est libre. Trois observations suggèrent que ces mouvements sont liés à la transduction. Premièrement, ils disparaissent lorsque l'on impose à la touffe ciliaire un biais très négatif (typiquement $< -200 nm$) qui doit fermer la quasi totalité des canaux. Deuxièmement, un rinçage pendant 10 s par de l'endolymphe contenant 5 mM de BAPTA (dont l'action est de couper les liens de bout de cil, voir I.C.4) les supprime irréversiblement. Enfin, l'ajout dans l'endolymphe de gentamicine (100 μM), un antibiotique connu pour bloquer les canaux de transduction [Kroese *et al*, 1989], supprime réversiblement ces mouvements, du moins quand ils sont induits par l'éjection d'un chélateur du calcium. Si l'on éjecte du calcium, des mouvements d'une dizaine de nm sont observés, même en présence de gentamicine. Ces mouvements pourraient résulter d'une compétition entre le calcium et la gentamicine pour le canal. Le calcium éjecté par iontophorèse (dont la concentration peut être multipliée par 10 grâce à la iontophorèse, et pour qui le canal a une grande affinité, voir I.C.2 et II.B.5.2) parviendrait à chasser la gentamicine du pore du canal, et rendrait à nouveau accessible la partie intracellulaire du complexe de transduction. Le kinocil n'est pas nécessaire à l'obtention de ces mouvements : ils ont été observés sur des touffes ciliaires dont le kinocil avait été involontairement découplé lors de la préparation. Plusieurs sources d'artefact ont été éliminées : lorsque le courant de iontophorèse passe brusquement de sa valeur de retenue à la valeur d'éjection, la micropipette a dans certains cas un petit mouvement transitoire, qui peut venir parasiter la mesure lorsqu'elle est en partie imagée sur les photodiodes. Pour éviter ce problème, nous prenons garde à

placer la micropipette de telle manière à ce que son image soit en dehors des photodiodes. D'autre part, lorsque la préparation se dégrade, il est possible que des débris cellulaires viennent adhérer entre la micropipette et la fibre, lui transmettant ce mouvement parasite. Ces débris peuvent être difficiles à remarquer, sauf lorsque l'on déplace la micropipette. Toutes les cellules présentant ce genre de problèmes ont été éliminées de l'analyse.

E.2. Inversions de polarité par un biais statique

L'application d'un biais positif fait chuter la proportion des touffes ciliaires qui bougent négativement en réponse à une iontophorèse d'ATP (un *t*-test de Student montre que ce changement de proportion est significatif avec un critère $p < 0,05$). Ceci suggère qu'un biais positif permet d'inverser la polarité du mouvement induit par un changement de $[Ca^{2+}]$ pour certaines de ces cellules.

Il a effectivement été possible d'induire un changement de polarité globale de la réponse de 15 touffes ciliaires en faisant varier le biais imposé à la touffe ciliaire, pour un même ion éjecté. Sur ces 15 cellules, 8 ont été étudiées en détail, toutes en endolympe-NMDG : 5 changements de polarité ont été observés en éjectant de l'ATP (Figure III-24.A) et 4 en éjectant du calcium (Figure III-25) ; une cellule a présenté un changement de polarité avec ces deux ions.

Les changements de polarité observés en chélatant le calcium sont dans le sens négatif→positif : pour des offsets faibles ou nuls, on observe un mouvement négatif de la touffe ciliaire de cinétique plus lente que celui à l'extinction de la stimulation. Ce mouvement devient progressivement biphasique pour des offsets intermédiaires, puis change complètement de polarité pour les grands offsets et devient donc positif. Le changement de polarité apparaît pour un offset valant $X_{-Ca} = 82 \pm 63$ nm (moyenne \pm écart moyen, $n = 5$), et dans une certaine gamme autour de ce point, l'amplitude des mouvements est une fonction affine de l'offset imposé, puis semble saturer (Figure III-24.B). Les cinétiques des mouvements négatifs sont toujours plus lentes que celles des mouvements positifs (Figure III-24.C). En particulier, lorsque la polarité de la réponse à l'état stationnaire est négative, la cinétique du mouvement qui suit le début de l'iontophorèse est plus lente que celle qui suit son extinction. Au point où cette polarité s'inverse, les cinétiques de ces mouvements s'inversent également : on observe toujours des mouvements plus rapides dans la direction positive que dans la direction négative.

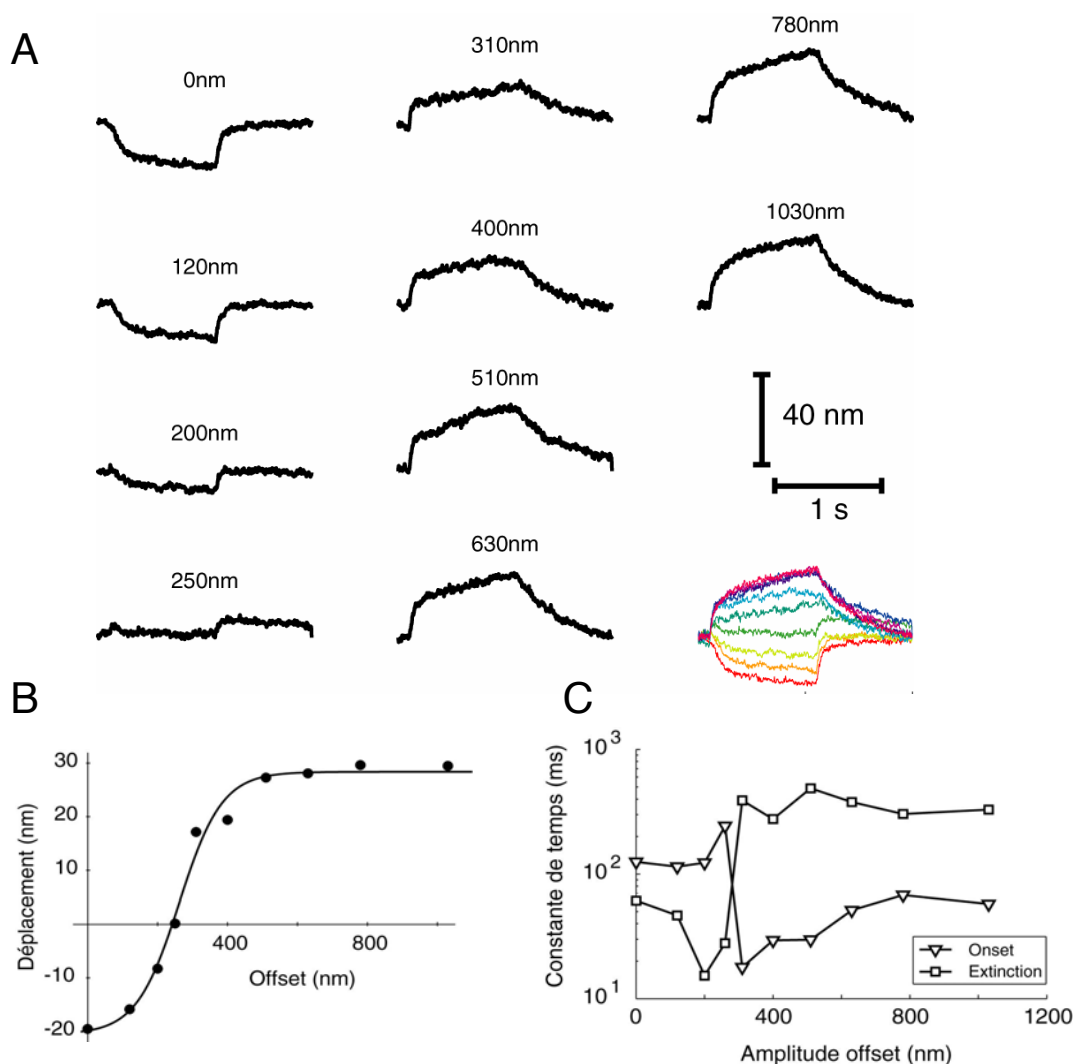


Figure III-24 : Inversion de polarité du mouvement induit en réponse à une marche iontophorétique d'ATP, par application d'un biais variable à la position au repos d'une touffe ciliaire. **A.** Réponses d'une touffe ciliaire soumise à une iontophorèse d'ATP (-50 nA, distance micropipette : 3 μ m) pour des biais croissants. **B.** Amplitude des mouvements induits en fonction du biais imposé, mesuré sur les 10 dernières millisecondes de l'échelon d'ATP. **C.** Constante de temps associée au mouvement (obtenu par ajustement d'une exponentielle) pour l'initiation et l'extinction de la stimulation.

Des changements de polarité en augmentant la concentration de calcium ont également été observés. Pour la cellule de la figure III-25.A, les réponses à une iontophorèse de Ca^{2+} sont biphasiques : une rapide excursion vers les X négatifs est suivie d'une phase plus lente. Pour des biais nuls ou négatifs, on observe parfois une seule phase lente et positive en réponse à la iontophorèse. Pour des biais croissants, une phase rapide de polarité négative apparaît et grandit en amplitude. Sur les 4 changements de polarité observé avec Ca^{2+} , 3 sont dans le sens positif \rightarrow négatif pour un offset moyen valant $X_{+Ca} = 11 \pm 194$ nm ($n=3$) et un dans le sens inverse pour un offset de ~ 1800 nm (Figure III-25.C). La cellule qui présentait

un changement de polarité à la fois pour une iontophorèse de triphosphate et de Ca^{2+} le faisait pour des offsets valant respectivement $X_{-Ca} = 30 \text{ nm}$ et $X_{+Ca} = -202 \text{ nm}$.

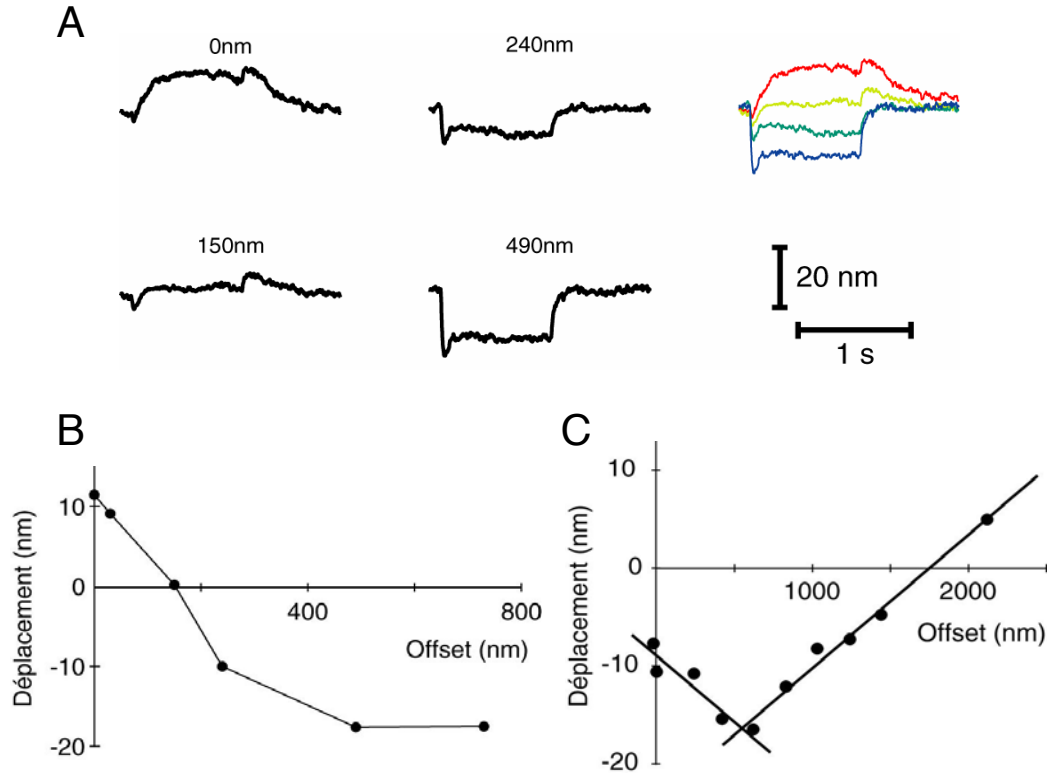


Figure III-25 : Inversion de polarité du mouvement induit en réponse à une marche iontophorétique de Ca^{2+} , par application d'un biais variable à la position au repos d'une touffe ciliaire. **A.** Réponses d'une touffe ciliaire soumise à une iontophorèse de CaCl_2 pour des offsets croissants (50 nA, distance micropipette : 3 μm). **B.** Amplitude des mouvements induits en fonction du biais imposé, mesuré sur les 10 dernières millisecondes de l'échelon de Ca^{2+} , pour la même cellule. **C.** Pour une autre cellule, présentant le changement de polarité négatif→positif, amplitude des mouvements induits en fonction du biais imposé, mesuré sur les 10 dernières millisecondes de l'échelon de Ca^{2+} . Droites noires : ajustement par des droites de pente respective $-13,6 \cdot 10^{-3}$ et $+13,6 \cdot 10^{-3}$. Le changement de polarité apparaît pour un biais valant $\sim 1800 \text{ nm}$.

IV. ANALYSE ET INTERPRETATION

Pour interpréter nos résultats, nous utilisons le modèle de la touffe ciliaire, présenté en I.F. Il s'agit d'une description minimale fondée sur seulement trois éléments :

- une relation force/déplacement contenant une zone non linéaire de faible pente, conséquence de l'activation mécanique directe des canaux ioniques de transduction et des forces internes à la touffe ciliaire qu'elle produit (équation I.13) ;
- de l'activité d'un moteur moléculaire couplé au ressort de transduction et dont la force d'arrêt contrôle P_o et sous-tend le processus d'adaptation mécanique (équation I.14) ;
- une rétroaction électromécanique entre la composante calcique du courant de transduction et la force que peut exercer ce moteur (équation I.11).

Aucun élément de ce modèle (en dehors de la force d'arrêt) ne dépend du calcium, contrairement aux modèles alternatifs présentés en I.D.6, utilisés pour décrire l'adaptation rapide et ses corrélats.

Lors de nos expériences, nous avons observé 3 classes de mouvements actifs (voir III.A) : des oscillations spontanées et des mouvements excitable en réponse à une stimulation positive (twitch positif) ou négative (twitch négatif). Nous avons montré que ces 3 classes pouvaient être indexées par la position du point de fonctionnement par rapport à la zone non-linéaire de faible pente de la caractéristique F/X de chaque touffe ciliaire : des oscillations spontanées sont observées conjointement à la mesure d'une courbe F/X possédant une région de raideur négative et qui contient le point de fonctionnement, les twitches positif et négatif correspondent à une situation où la zone non-linéaire est centrée en un déplacement respectivement positif et négatif par rapport au point de fonctionnement. En contraignant les paramètres mécaniques du modèle présenté au paragraphe I.G et le point de fonctionnement pour rendre compte de nos mesures de courbes force/déplacement, nous montrons dans la suite comment on peut reproduire et interpréter ces 3 classes de mouvements actifs.

A. Mouvements ciliaires actifs

A.1. Oscillations spontanées

Le modèle que nous utilisons ici a été précédemment utilisé avec succès pour décrire très finement les oscillations spontanées des cellules ciliées du saccule de la grenouille taureau [Nadrowski *et al*, 2004]. Dans le cas où la relation F/X renferme une zone instable de raideur négative, il existe une gamme de probabilité d'ouvertures interdites correspondant à des points de fonctionnement instables (voir la figure I-18). Si la force d'arrêt du moteur à l'état stationnaire est telle que la probabilité d'ouverture au repos est dans cette gamme interdite, le moteur est contraint d'osciller, entraînant la touffe ciliaire avec lui (voir I.F). La trajectoire dans le diagramme F/X prend alors la forme d'un cycle d'oscillation limite autour de la région de raideur négative, ce qui se traduit dans la dynamique de la touffe ciliaire par des oscillations biphasiques (Figure IV-1).

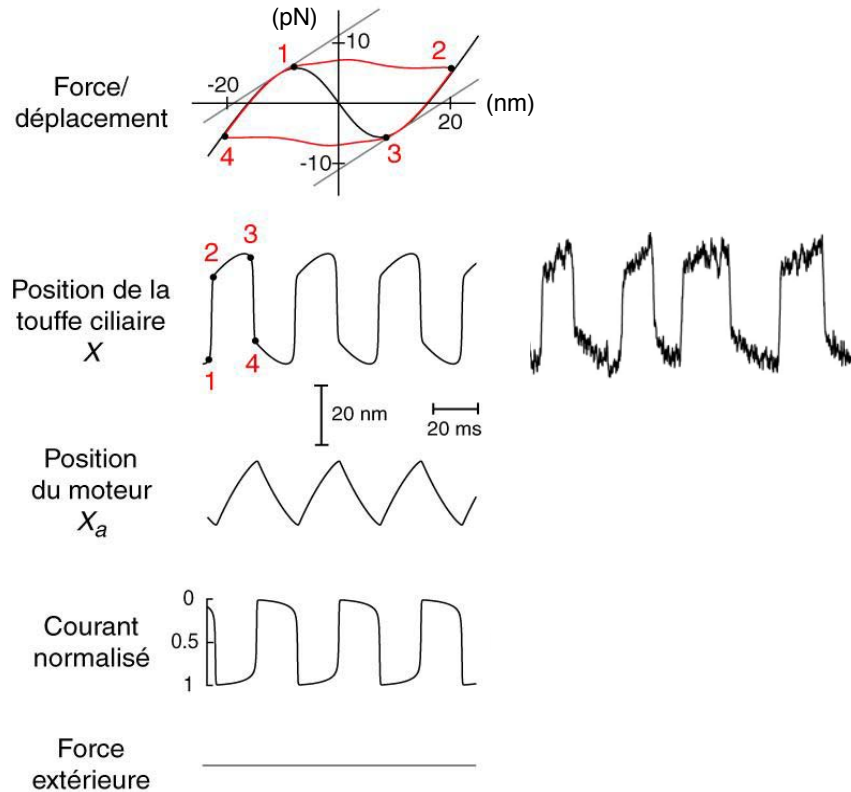


Figure IV-1 : Simulations numériques des oscillations spontanées, décrites dans la partie III.A.1, en utilisant le modèle décrit dans le paragraphe I.G. Les paramètres utilisés sont donnés dans l'annexe G, colonne A, avec $\lambda = 2,8 \cdot 10^{-4}$ pN.s/nm. Le courant normalisé est égal à P_o , et tracé à l'envers pour mimer la représentation classique du courant de transduction. Le point de fonctionnement de la cellule est au milieu de la zone instable, et correspond dans ce cas à la probabilité d'ouverture au repos $P_o = 0,5$; la touffe ciliaire exhibe des oscillations symétriques. Lorsque la trajectoire dans le diagramme F/X traverse la zone instable ($1 \rightarrow 2$ et $3 \rightarrow 4$), on observe un saut abrupt dans le mouvement de la touffe ciliaire. Les instants de ces sauts correspondent aux moments où le mouvement du moteur change de polarité. La probabilité d'ouverture instantanée varie de $\sim 90\%$ lors de l'un de ces sauts. Droite : oscillations simulées avec les mêmes paramètres, en tenant compte du bruit.

A.2. Comportements excitables

Ce modèle simple n'avait pas été jusqu'ici testé pour interpréter les autres régimes dynamiques observés expérimentalement. Nous avons cherché à reproduire numériquement les conditions expérimentales dans lesquelles les comportements excitables (twitches positifs et négatifs) sont observés. Les valeurs des paramètres du modèle sont, chez la grenouille, fortement contraintes par l'expérience (Tableau II-3). Les paramètres K_{GS} , K_{SP} , N et D contrôlent la forme de la caractéristique F/X

et sont donc choisis pour produire une courbe F/X ressemblant à celles mesurées expérimentalement sur le saccule de la grenouille. Les paramètres λ et λ_a peuvent être estimés respectivement à partir de l'analyse expérimentale et théorique des fluctuations d'une touffe ciliaire (voir le paragraphe I.E.3) et de la cinétique d'adaptation (voir le paragraphe I.D.5.3). L'ajustement des fonctions de réponse d'une touffe ciliaire oscillante [Nadrowski *et al*, 2004] a montré que la force d'arrêt maximale f_{\max} est de l'ordre 400 pN pour les cellules ciliées du saccule de la grenouille taureau. Pour définir le point de fonctionnement de la cellule, nous avons ajusté le paramètre S , qui traduit l'effet du calcium sur la force d'arrêt du moteur de l'adaptation. Ce paramètre est de l'ordre de 1 pour une cellule oscillante plongée dans l'endolymphe [Nadrowski *et al*, 2004]. Comme cette grandeur est proportionnelle à la concentration de calcium extracellulaire, on utilise une valeur environ 5 fois plus grande pour simuler les conditions du twitch positif, qui est observé majoritairement dans un milieu à fort calcium pour lequel la majorité des canaux de transduction sont fermés. On obtient alors une courbe F/X possédant une zone non linéaire centrée en un déplacement positif par rapport au point de fonctionnement (Figure IV-2). Pour obtenir une zone non linéaire centrée en un déplacement négatif par rapport au point de fonctionnement, comme c'est le cas lorsque l'on observe du twitch négatif (Figure IV-12), nous avons à l'inverse utilisé des valeurs de S plus petites ($\sim 0,2$) que celles mesurées sur une cellule oscillante.

Dans ces conditions, les simulations numériques montrent que le système dynamique est stable, mais répond à une stimulation par un mouvement dont la dynamique ressemble à celle observée expérimentalement. Un système dynamique dont la courbe F/X possède une zone de raideur négative ou de faible pente positive centrée en un déplacement positif par rapport au point de fonctionnement répond à un échelon de force positive par un mouvement possédant une composante de polarité négative (Figure IV-2). Ce mouvement de recul apparaît dans les millisecondes qui suivent l'application du stimulus, et correspond à la traversée par la trajectoire dans le diagramme F/X de la zone non linéaire. La dynamique du mouvement, ainsi que celle du courant normalisé, est similaire à celle que l'on observe expérimentalement sur une cellule du saccule de la grenouille taureau exhibant du twitch positif (voir III.A.2 et [Benser *et al*, 1996]).

Nous ne sommes pas parvenus dans nos expériences à mesurer une courbe F/X possédant une région de raideur négative conjointement à l'observation du twitch positif. Il n'est toutefois pas exclu que cette situation puisse être rencontrée. En périlymphe, nous avons observé expérimentalement sur quelques cellules que des oscillations spontanées de la touffe ciliaire pouvaient être induites en biaisant leur position par un offset statique positif (voir paragraphe III.C.2). Ceci suggère que dans les conditions où l'on observe usuellement du twitch positif, certaines cellules peuvent posséder une zone de raideur négative dans leur caractéristique F/X , centrée en un déplacement positif par rapport au point de fonctionnement. Les

simulations numériques montrent que le comportement dynamique obtenu en réponse à un échelon de stimulation est qualitativement le même pour une cellule possédant ou ne possédant pas de zone de raideur négative dans sa caractéristique F/X (Figure IV-2.A et B).

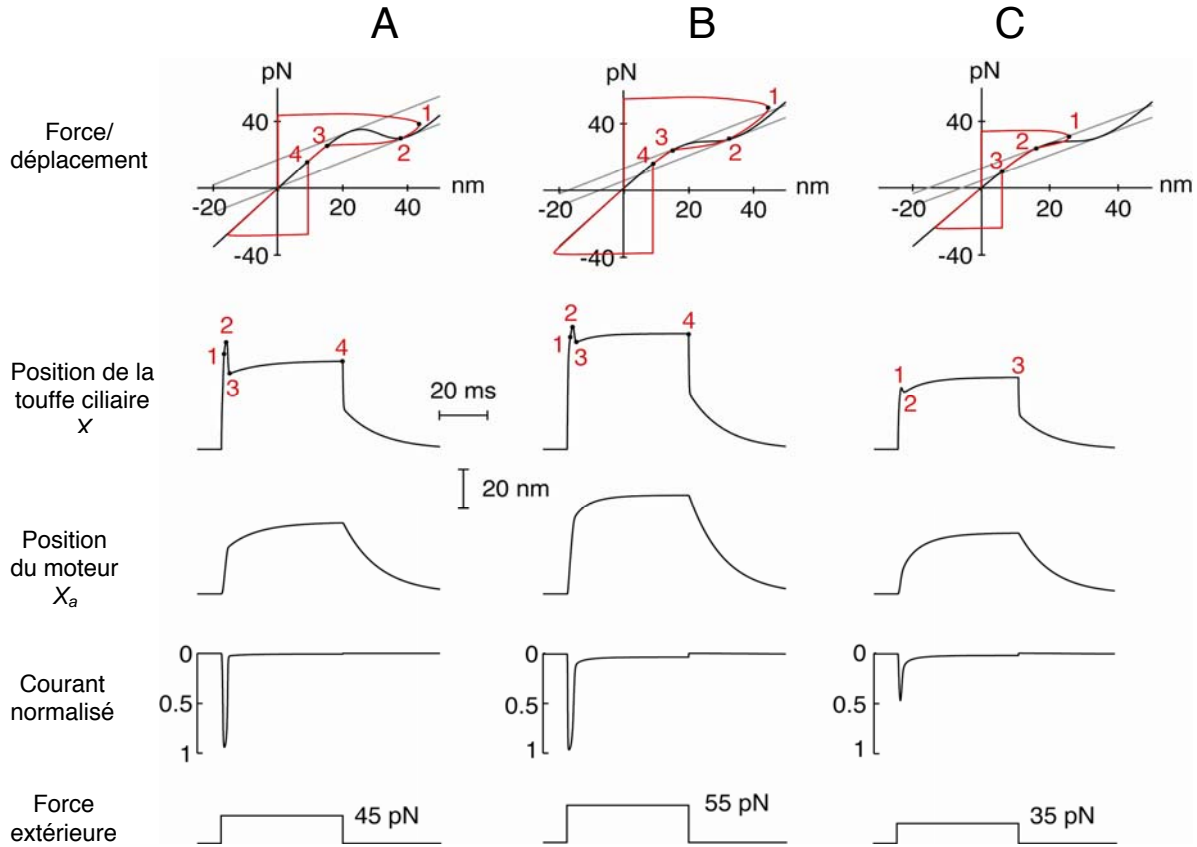


Figure IV-2 : Simulation numérique du twitch positif, pour deux systèmes dynamiques, l'un possédant une zone de raideur négative dans sa caractéristique F/X , l'autre une zone de raideur faible mais positive en tout point dans cette caractéristique. **A.** Paramètres de l'annexe G, colonne F, en réponse à un échelon de force de 45 pN. Le mouvement de recul 2→3 observé correspond dans le diagramme F/X à la traversée de la région instable de la caractéristique F/X . À la fin de ce mouvement, la probabilité d'ouverture est quasiment revenue à sa valeur initiale. **B.** Paramètres de l'annexe G, colonne E, en réponse à un échelon de force de 55 pN. Le mouvement de recul 2→3 observé correspond dans le diagramme F/X à la traversée de la région de raideur faible, comprise entre deux droites de pente K_{Sp} tangentes à la courbe F/X (droites grises). **C.** Avec les mêmes paramètres que pour la figure B, en réponse à un échelon de force de 35 pN. Cette stimulation ouvre transitoirement ~45% des canaux ; la trajectoire dans le diagramme F/X ne traverse alors pas complètement la zone de raideur non linéaire, et le mouvement adaptatif positif qui précède le mouvement de recul n'est plus visible dans le mouvement ciliaire : on observe au contraire un point de rebroussement. Dans tous les cas, le mouvement de la touffe ciliaire présente 2 changements de polarité, alors que le mouvement du moteur est strictement monotone.

Dans le cas où la caractéristique F/X possède une région de raideur négative, l'interprétation du mouvement de recul 2→3 observé est simple : il traduit la traversée de la zone instable dans le diagramme F/X , et ressemble à un demi-cycle d'oscillation autour de cette zone (comparer les figures IV-2.A et IV-1). La vitesse de la touffe ciliaire lors de ce mouvement de recul est limitée seulement par la donnée de λ et non par la cinétique du moteur : elle est au maximum de 30 $\mu\text{m/s}$, alors que la vitesse du moteur en ce point est de 3,7 $\mu\text{m/s}$. Dans le cas où la caractéristique F/X ne possède pas de raideur négative (Figure IV-2.B), la vitesse lors du mouvement de recul culmine à environ 10,5 $\mu\text{m/s}$, alors qu'au même moment celle du moteur d'adaptation n'est que de 5,6 $\mu\text{m/s}$. La différence entre les deux dynamiques (avec et sans raideur négative) n'est que quantitative ; l'observation expérimentale du twitch en périlymphe ne permet pas de statuer sur l'existence d'une zone de raideur négative pour des touffes ciliaires plongées dans ce milieu.

Sur les figures IV-2.A et B, le mouvement de recul 2→3 est précédé d'un mouvement lent adaptatif positif 1→2. Pour une gamme de déplacement telle que la valeur maximale de la probabilité d'ouverture soit d'environ 50 %, la trajectoire dans le diagramme F/X est déjà portée par la zone non linéaire lorsque le processus d'adaptation commence. La composante lente positive qui précède le mouvement de recul sur la figure IV-2 disparaît alors, et l'on obtient un twitch avec un changement de polarité brusque (Figure IV-2.C).

A.2.1. Polarité des mouvements ciliaires adaptatifs

Lorsque la caractéristique F/X ne possède pas de zone instable mais seulement une zone de faible raideur positive, la dynamique ne peut être interprétée comme un cycle d'oscillation ; pourtant on observe un mouvement qui ressemble au twitch positif. Nous précisons ici les conditions d'observations du mouvement de recul obtenu.

On se place dans les conditions d'observations du twitch positif. En réponse à un échelon de stimulation positive qui ouvre une grande partie des canaux de transduction, deux processus distincts génèrent un mouvement adaptatif de la touffe ciliaire. On se place premièrement dans le cas idéalisé d'une stimulation par une fibre souple qui ouvre la totalité des canaux, entraînant un mouvement adaptatif sans que la probabilité d'ouverture ne change de manière significative lors de ce mouvement (Figure IV-3.A). Cette situation hypothétique est proche de celle rencontrée expérimentalement pour des stimuli saturants très intenses, dans les premières dizaines de millisecondes qui suivent l'application du stimulus (voir la figure I-11.A). L'ouverture des canaux va entraîner une brusque augmentation du calcium extracellulaire. La force générée par le moteur de l'adaptation diminue en

conséquence, et le complexe de transduction glisse vers la racine des stéréocils. Ce glissement entraîne une diminution de la tension T_{GS} dans le ressort de transduction et la touffe ciliaire exhibe un mouvement de relaxation adaptatif X_r dans la direction du stimulus.

Considérons un second cas d'école, où la conséquence de l'entrée du calcium dans la touffe ciliaire après une stimulation positive est de refermer la totalité des canaux alors que le mouvement du moteur de l'adaptation est nul ou négligeable (Figure IV-3.B). Cette refermeture augmente la tension dans le ressort de transduction, ce qui rabat la touffe ciliaire en arrière d'une quantité X_t .

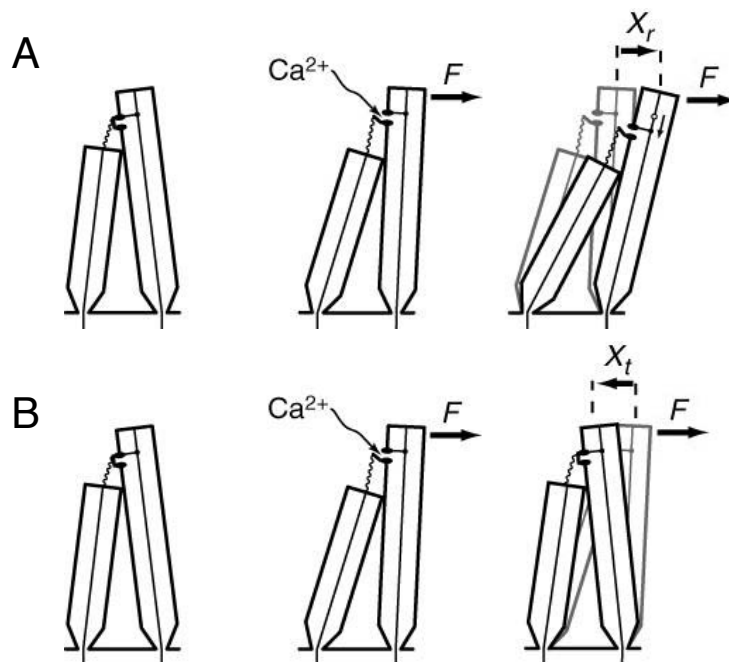


Figure IV-3 : Corrélatés mécaniques hypothétiques du processus d'adaptation lorsque celui-ci est décomposé en deux mécanismes idéalisés. **A.** On suppose qu'après une grande déflexion positive, les canaux sont ouverts et restent ouverts même lorsque le moteur se déplace. Celui-ci va glisser vers la racine des stéréocils sous l'effet de l'influx de calcium et de l'augmentation de la tension dans les ressorts de transduction. On observe alors un mouvement de relaxation de la touffe ciliaire X_r dans la direction de stimulation. **B.** Si on suppose que sous l'effet de l'influx de calcium, les canaux ouverts par la stimulation se referment tous, sans que le moteur de l'adaptation ne bouge, la refermeture des canaux va retendre le ressort de transduction et rabattre en arrière la touffe ciliaire. On observe alors un mouvement de la touffe ciliaire X_t dans la direction négative.

Le mouvement adaptatif du moteur et la refermeture des canaux de transduction produisent donc, si l'un opère sans l'autre, des mouvements de polarité opposée. Mais un mouvement du moteur de l'adaptation peut également entraîner une refermeture significative des canaux ; dans la situation réelle où les deux processus se produisent simultanément, la situation est donc plus complexe. Dans le

cadre de notre modèle simple, il n'y a pas d'élément du complexe de transduction pouvant se lier au calcium et directement refermer les canaux, comme c'est le cas pour les modèles présentés en I.D.6. La refermeture des canaux ne peut se produire qu'au travers d'un mouvement adaptatif du moteur de l'adaptation. Peut-on observer un mouvement δX de la touffe ciliaire négatif suite à un mouvement adaptatif du moteur δX_a qui soit positif, en réponse à une force extérieure constante ? Supposons que les termes visqueux soient négligeables dans les équations I.13 et I.14 de notre modèle. Ceci revient à considérer que la trajectoire dans le diagramme F/X qui décrit la dynamique de la touffe ciliaire est portée par la courbe F/X de la touffe ciliaire (voir I.G.2). En différenciant l'équation I.13, il vient

$$0 = K_{GS} \left(1 - \frac{D}{\delta} P_o (1 - P_o) \right) (\delta X - \delta X_a) + K_{SP} \delta X$$

$$\delta X = \frac{\tilde{K}_{GS}}{\tilde{K}_{GS} + K_{SP}} \delta X_a \quad (\text{IV.1})$$

avec $\tilde{K}_{GS} = K_{GS} \left(1 - \frac{D}{\delta} P_o (1 - P_o) \right)$. Deux conditions réalisent $\delta X < 0$ avec $\delta X_a > 0$:

$$\tilde{K}_{GS} > 0 \text{ et } \tilde{K}_{GS} + K_{SP} < 0 \quad (\text{IV.2})$$

$$\text{ou} \quad \tilde{K}_{GS} < 0 \text{ et } \tilde{K}_{GS} + K_{SP} > 0 \quad (\text{IV.3})$$

La première de ces deux conditions n'est pas réalisable, K_{SP} étant strictement positif. Dans le cas où la raideur dynamique $\tilde{K}_{GS} + K_{SP}$ de la touffe ciliaire demeure en tout point positive (pas de zone instable), la condition $\tilde{K}_{GS} < 0$ se traduit par

$$P_o (1 - P_o) > \frac{K_{GS} D^2}{k_B T} \quad (\text{IV.4})$$

soit, dans le cas le plus favorable ($P_o = 1/2$) par $D > 4\delta$, c'est-à-dire, en se souvenant que $\delta = \frac{N k_B T}{K_{GS} D}$

$$\frac{K_{GS} D^2}{N} = k_{GS} d^2 > 4 k_B T \quad (\text{IV.5})$$

On compare donc une énergie élastique typique pour l'ouverture d'un canal à l'énergie d'agitation thermique.

Si l'amplitude du changement conformationnel lié à l'activation d'un canal de transduction n'est pas assez importante, le mouvement adaptatif sera toujours dans le sens de la force extérieure. Ceci indique que le twitch sera observé seulement si l'assouplissement de la touffe ciliaire lié à l'activation des canaux est suffisamment important.

A.2.2. Tension dans le ressort de transduction et implications du modèle

Le mouvement de recul observé expérimentalement pour une cellule présentant un twitch positif est attribué à la refermeture des canaux induite par un mouvement adaptatif du moteur dans les millisecondes qui suivent une déflexion positive (Figure IV-4). Selon le modèle de la transduction mécanique directe, une déflexion positive met le ressort de transduction sous tension, ce qui a pour conséquence d'ouvrir les canaux. Il s'ensuit un influx de calcium dans le stéréocil et la partie intracellulaire du complexe de transduction est soumise à une augmentation de $[Ca^{2+}]_{intra}$ d'autant plus importante que la concentration extracellulaire en calcium est importante. Les modèles alternatifs présentés dans le paragraphe I.D.6 supposent que c'est cette augmentation brusque de $[Ca^{2+}]_{intra}$ qui est à l'origine de la refermeture des canaux : les ions calcium se lient à un des éléments intracellulaires du complexe de transduction et stabilise de manière directe l'état fermé des canaux. En se refermant, les canaux retendent le ressort de transduction, ce qui génère le mouvement de recul du twitch.

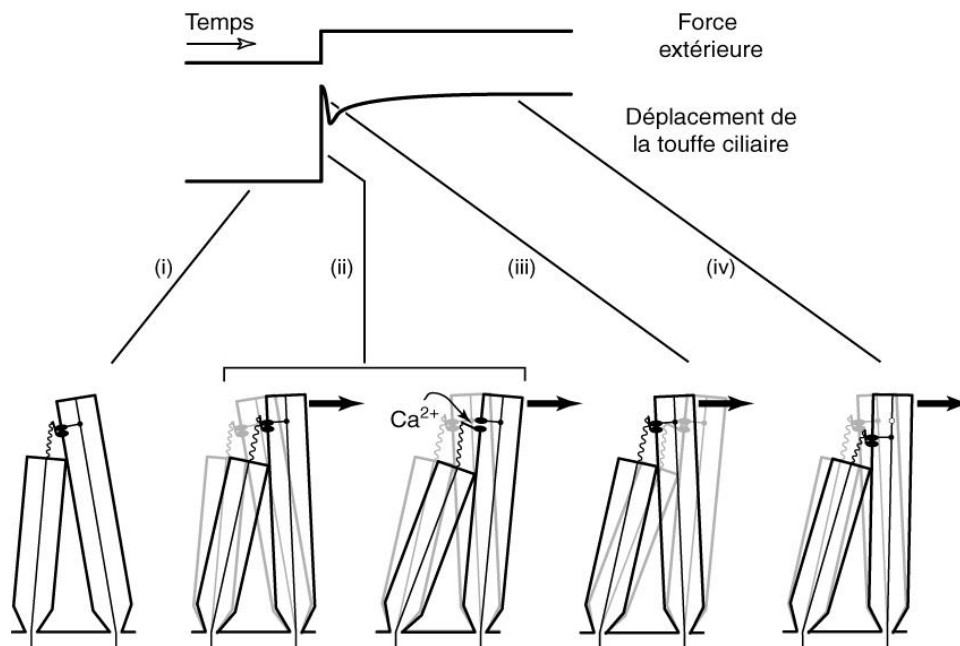


Figure IV-4 : Interprétation schématique du twitch positif. La touffe ciliaire est initialement quiescente (i). En réponse à une force extérieure positive, elle est défléchie et le ressort de transduction est mis sous tension. Cette augmentation de tension ouvre les canaux et permet l'entrée de calcium (ii). Cette entrée de calcium entraîne une refermeture des canaux ce qui rabat la touffe ciliaire en arrière (iii). Le moteur glisse ensuite vers la racine des stéréocils et la touffe ciliaire exhibe un mouvement adaptatif positif, jusqu'à ce que la tension dans le ressort de transduction initiale soit restaurée (iv).

Notre modèle simple ne possède pas d'élément (autre que la force d'arrêt F_a) dépendant du calcium. La refermeture des canaux est ici causée par un mouvement du moteur de l'adaptation X_a . L'étude de la dynamique de la tension T_{GS} dans le ressort de transduction lors d'une stimulation positive permet de préciser le mécanisme du twitch (Figure IV-5). Cette tension, mesurée selon l'axe de stimulation, est définie par

$$T_{GS} = K_{GS}(\bar{X} - \bar{X}_a - DP_o)$$

Pour \bar{X}_a fixé, P_o dépend de \bar{X} au travers d'une fonction sigmoïdale. Dans les premières dizaines de microsecondes qui suivent l'application du stimulus, la touffe ciliaire est défléchie sans que P_o et \bar{X}_a n'évoluent de manière significative, et la tension T_{GS} augmente rapidement jusqu'à un maximum local (point 1 sur la figure IV-5). Les canaux s'ouvrent ensuite, et le terme $-DP_o$ devient important dans l'expression de T_{GS} : cette tension est relaxée de part l'ouverture des canaux et atteint un minimum local (point 2 sur la figure IV-5). Une mesure de la caractéristique F/X réalisée en cet instant révélerait que la touffe ciliaire exhibe de l'assouplissement dû à la transduction pour ce déplacement. L'ouverture des canaux s'est faite sans que le moteur \bar{X}_a ne se déplace de manière significative. Lorsque la probabilité d'ouverture est à son maximum, la concentration de calcium à proximité du moteur est importante, et celui-ci glisse d'autant plus rapidement vers la racine des stéréocils (ce qui se traduit par une variation de \bar{X}_a positive). Ce mouvement du moteur referme les canaux, et le terme $-DP_o$ s'annule à nouveau. La tension T_{GS} atteint alors un second maximum local (point 3 sur la figure IV-5) et la touffe ciliaire est rabattue dans la direction négative : on observe le mouvement de recul du twitch. Comme les canaux sont refermés, la concentration de calcium à laquelle est soumis le moteur est à nouveau faible, et sa cinétique de glissement est ralentie en conséquence. La tension T_{GS} relaxe avec la même cinétique, et on observe le mouvement ciliaire adaptatif dans la direction positive, caractéristique de l'adaptation dite lente.

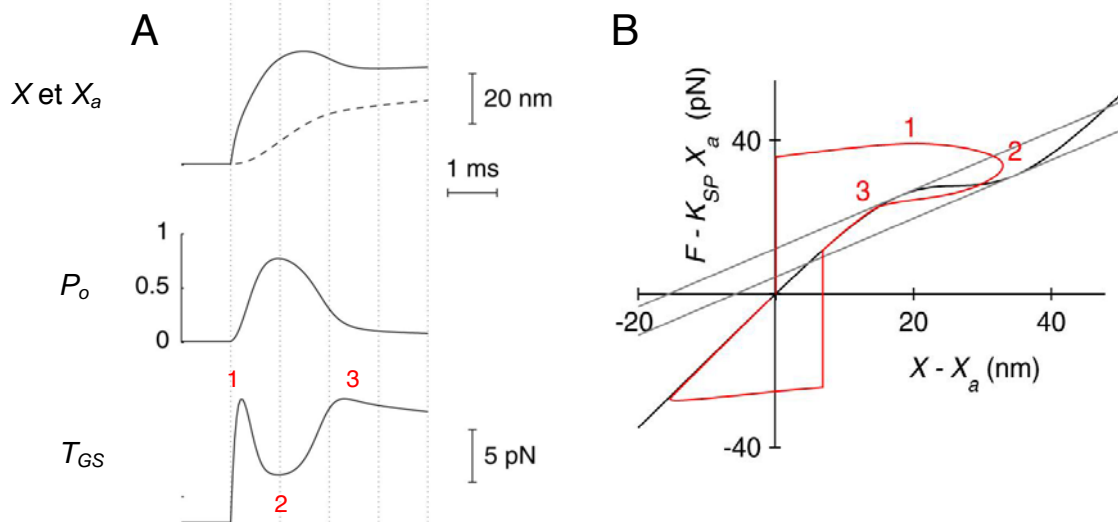


Figure IV-5 : Tension dans le ressort de transduction T_{GS} lors d'un twitch positif. Paramètres donnés dans l'annexe G, colonne E. **A.** Haut : mouvement de la touffe ciliaire X (trait plein) et mouvement du moteur X_a (trait en pointillés) observés en réponse à un échelon de force de 40 pN. Milieu : Probabilité d'ouverture. Bas : tension dans le ressort de transduction. 1. Dans les 100 premières μs , X augmente alors que X_a et P_o restent pratiquement nuls ; la tension T_{GS} atteint rapidement un premier maximum local. 2. Au bout de ~ 1 ms, les canaux sont ouverts, alors que X_a ne s'est pas déplacé de manière significative. Le terme $-D \cdot P_o$ dans l'expression de T_{GS} devient important, et contribue à la diminution de T_{GS} qui atteint un minimum local. Réalisée en cet instant, une mesure expérimentale de la courbe F/X mettrait en évidence le phénomène d'assouplissement dû à la transduction. 3. Le moteur a maintenant un déplacement important, alors que X varie peu. En vertu de l'équation 1.15, les canaux se referment, le terme $-D \cdot P_o$ décroît fortement et la tension T_{GS} augmente. En 3, la cellule exhibe le mouvement de recul du twitch. Postérieurement à cet instant, le moteur continue d'adapter et la tension T_{GS} décroît lentement, et X exhibe la relaxation mécanique lente corrélée de l'adaptation. **B.** Trajectoire dans le diagramme F/X associée.

A.2.3. Interprétation géométrique du twitch positif

En remarquant que $K_{HB} = \tilde{K}_{GS} + K_{SP}$ est la pente locale de la courbe F/X (voir le paragraphe I.E.2.1), on peut réécrire l'inégalité IV.3 : $0 < K_{HB} < K_{SP}$. Sur une caractéristique F/X où tous les points ont une pente positive, cette condition se traduit géométriquement par l'existence sur cette courbe d'une région où la raideur est inférieure à K_{SP} . Le mouvement ciliaire qui résultera de la traversée de cette région de raideur faible sera négatif si $\delta X_a > 0$. Cette zone de raideur inférieure à K_{SP} est délimitée par un corridor entre les deux droites de pentes K_{SP} et tangentes à la courbe F/X .

On peut alors détailler la dynamique de la touffe ciliaire lorsqu'elle exhibe du twitch positif, en se servant d'un graphe F/X muni d'une origine absolue (Figure IV-6). L'origine de ce graphe est le point de fonctionnement au repos de la cellule, c'est-à-dire sa position à force extérieure nulle dans l'état stationnaire. Cette cellule possède une région de raideur inférieure à K_{SP} centrée en un déplacement positif. Soumise à un échelon de force F_S , la touffe ciliaire répond d'abord par un déplacement élastique ΔX_{el} donné par l'intersection de la courbe F/X avec la droite $F=F_S$ (Figure IV-6.A). Sa probabilité d'ouverture passe ici d'une valeur faible à une valeur élevée. Il va s'ensuivre un déplacement adaptatif du moteur qui va chercher à restaurer, en présence de cette force statique, la probabilité d'ouverture initiale. Ce mouvement se traduit géométriquement par un glissement de la courbe F/X selon une droite de pente K_{SP} (voir le paragraphe I.G.2). La position de la touffe ciliaire est toujours donnée par l'intersection de la courbe F/X avec la droite $F=F_S$, et a glissé d'un déplacement adaptatif supplémentaire ΔX_{adapt1} positif (Figure IV-6.B). Lorsque le glissement de cette courbe est tel que la zone de faible raideur atteint l'ordonnée $F=F_S$, la touffe ciliaire exhibe un mouvement ΔX_{twitch} négatif (Figure IV-6.C), parce que la pente locale de cette région est inférieure à celle du glissement de la courbe F/X . Comme l'étendue de cette zone non linéaire correspond à celle de sensibilité mécano-électrique, la probabilité d'ouverture passe d'une valeur très élevée à une valeur très faible entre les points 2 et 3. Le glissement de la touffe ciliaire continue une fois traversée cette zone plate, ce qui se manifeste par un mouvement adaptatif positif (Figure IV-6.D). Si l'on suppose que l'adaptation est complète, le mouvement du moteur stoppe lorsque la probabilité d'ouverture en présence de la force F_S est la même que celle à force nulle. Comme une valeur de P_o correspond de manière univoque à un point de la courbe F/X , l'adaptation cesse lorsque le point de la courbe F/X initialement en l'origine du graphe est, en présence de la force extérieure, en l'ordonnée $F=F_S$.

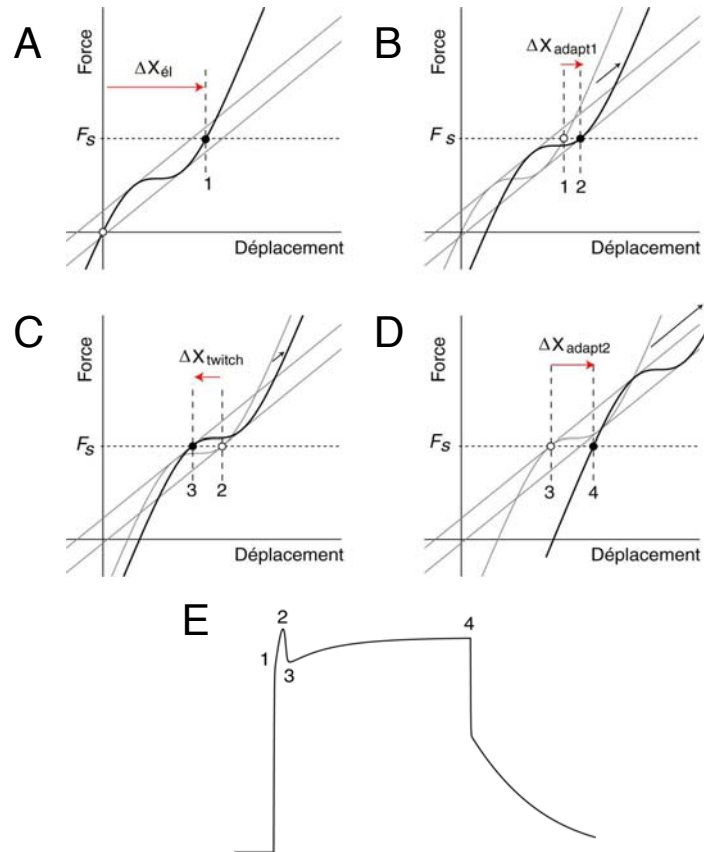


Figure IV-6 : Interprétation géométrique du twitch positif. La courbe F/X tracée (courbe noire) est celle d'une cellule ayant le comportement dynamique twitch positif : la zone non linéaire est centrée en un déplacement positif par rapport au point de fonctionnement. Les droites grises sont les droites de pente K_{SP} tangentes à la courbe. Le diagramme F/X est muni d'une origine absolue, le point $X=0, F=0$ correspond à l'état stationnaire de la cellule non stimulée. **A.** La cellule est stimulée par un échelon de force d'amplitude F_s . Elle répond d'abord avec un déplacement élastique $\Delta X_{él}$ avant que le moteur de l'adaptation ne se déplace. Noter que ce premier déplacement est plus grand que celui qu'aurait donné une cellule dont la courbe F/X ne posséderait pas de zone non linéaire aplatie. **B.** En réponse à ce stimulus maintenu, le moteur de l'adaptation se déplace, ce qui se traduit par un glissement de la courbe F/X dans le diagramme selon les droites de pente K_{SP} . Ce glissement entraîne dans un premier temps un déplacement ΔX_{adapt1} positif. **C.** La courbe F/X continue de glisser, et la trajectoire dans le diagramme F/X traverse la zone plate de la courbe F/X . Parce que cette zone a une pente plus faible que K_{SP} , le mouvement de la touffe ciliaire ΔX_{twitch} qui s'ensuit est négatif. **D.** Une fois cette zone traversée, le glissement final de la courbe F/X se traduit par un mouvement ΔX_{adapt2} dans la direction positive. **E.** Mouvement X de la touffe ciliaire associé.

On comprend avec cette interprétation qu'une stimulation dans la direction négative ne donne pas de twitch. L'observation d'un mouvement de recul est conditionnée par la traversée par la trajectoire dans le diagramme F/X de la zone

non linéaire de raideur faible, ce qui ne se produit pas lors du mouvement adaptatif en réponse à un échelon de force négative.

A.2.4. Remarque : le twitch est un effet cinétique

Dans les simulations numériques, les trajectoires dans le diagramme F/X sur les figures IV-2.A et B se détachent sensiblement de la courbe F/X . Lorsque la vitesse de la touffe ciliaire devient importante, comme c'est le cas lors du mouvement de recul 2→3, le terme de friction visqueuse devient important et la trajectoire quitte la courbe. Ceci ne change pas qualitativement les prévisions faites avec l'interprétation géométrique du paragraphe précédent.

Ce schéma d'interprétation serait exact dans la limite où $\lambda \rightarrow 0$ ou $\lambda \ll \lambda_a$. Le mouvement de la touffe ciliaire est alors toujours beaucoup plus rapide que celui du moteur de l'adaptation, et le point de fonctionnement correspondant est toujours porté par la courbe F/X . Si, à l'inverse, on suppose que les constantes cinétiques λ et λ_a sont proches, l'interprétation quasi-statique devient fautive. Pour illustrer ce fait, nous avons tracé la dynamique du twitch positif lorsque le rapport entre ces deux constantes se rapproche de l'unité (Figure IV-7). En deçà d'une certaine valeur de λ_a/λ (ici environ 5), on n'observe plus de mouvement de recul quelle que soit l'amplitude de stimulation.

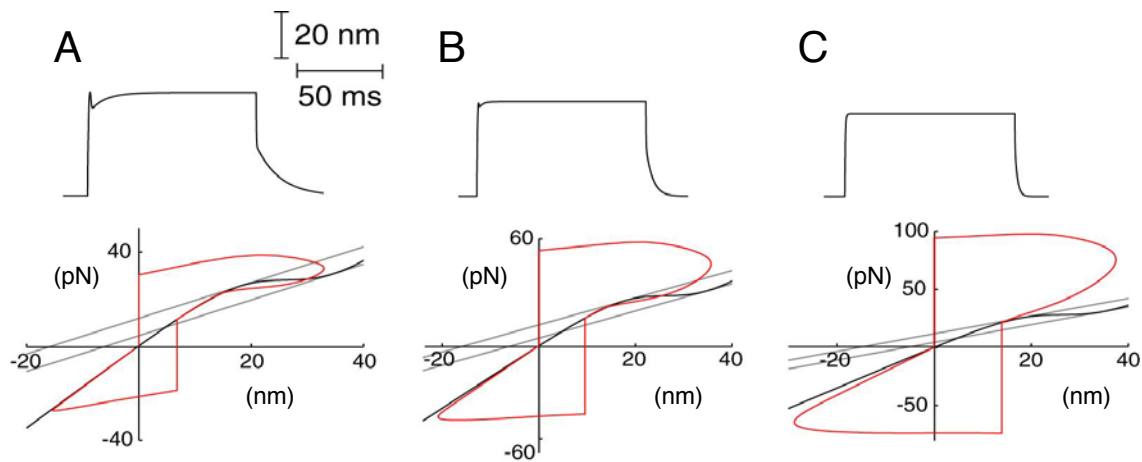


Figure IV-7 : Le twitch disparaît quand les constantes cinétiques λ et λ_a sont proches. Haut : mouvement de la touffe ciliaire évoqué par une marche de force de respectivement 40 pN, 60 pN et 100 pN. Bas : trajectoire dans le diagramme F/X associée (abscisse : $X-X_a$ en nm, ordonnée : $F-K_{sp}X_a$ en pN). Paramètres utilisés : annexe G, colonne E ; λ fixé et λ_a variable. **A.** $\lambda_a/\lambda \approx 36$. **B.** $\lambda_a/\lambda \approx 10$. **C.** $\lambda_a/\lambda \approx 4$.

A.2.5. Amplitude du twitch

Nous avons observé expérimentalement que l'amplitude du mouvement de recul dépend de l'intensité du stimulus appliqué (Figure III-3). Pour mimer le comportement de la cellule de la figure III-3.B et III-4, le point de fonctionnement du système dans sa relation F/X est choisi pour qu'il existe une gamme de déflexions de faibles amplitudes, entre 0 et 10 nm, pour laquelle aucun mouvement de recul n'est observé dans le mouvement ciliaire (Figure IV-8.A et B) : les trajectoires correspondantes dans le diagramme F/X ne traversent pas la zone non linéaire de faible pente. Au delà d'un seuil de stimulation, cette trajectoire traverse progressivement la zone non linéaire et un mouvement de recul d'amplitude croissante est alors observé. Pour les stimuli intenses, la trajectoire doit décrire une portion pentue de la courbe F/X d'autant plus étendue que l'amplitude de stimulation est importante, avant d'atteindre la zone de raideur inférieure à K_{Sp} . Par conséquent, le maximum local du mouvement ciliaire est atteint de plus en plus tard lorsque l'amplitude de stimulation croît. L'adaptation étant incomplète, le point de fonctionnement de la touffe ciliaire en présence d'un échelon de force extérieure est différent du point de fonctionnement au repos : en réponse à un stimulus statique positif, le point de fonctionnement glisse vers les déplacements positifs. Dans notre modèle, c'est le ressort d'extension, de raideur K_{ES} , qui contrôle ce processus. Nous avons ajusté la valeur $K_{ES} \approx 1,5$ pN/nm pour que le déplacement du moteur X_a soit à l'état stationnaire 80% de l'amplitude de la déflexion ciliaire X (voir le paragraphe I.D.1). Le twitch disparaît lorsque le point de fonctionnement en présence de l'échelon de force quitte la zone non linéaire du diagramme F/X (Figure IV-8.C et D). Nos simulations parviennent donc à rendre compte de la forme en cloche de la courbe qui représente l'amplitude du twitch en fonction du déplacement statique de la touffe ciliaire (Figure IV-8.B). La gamme 10-80 nm de déplacements statiques de la touffe ciliaire dans laquelle on observe un mouvement de recul est en accord avec nos expériences (Figure III-3C).

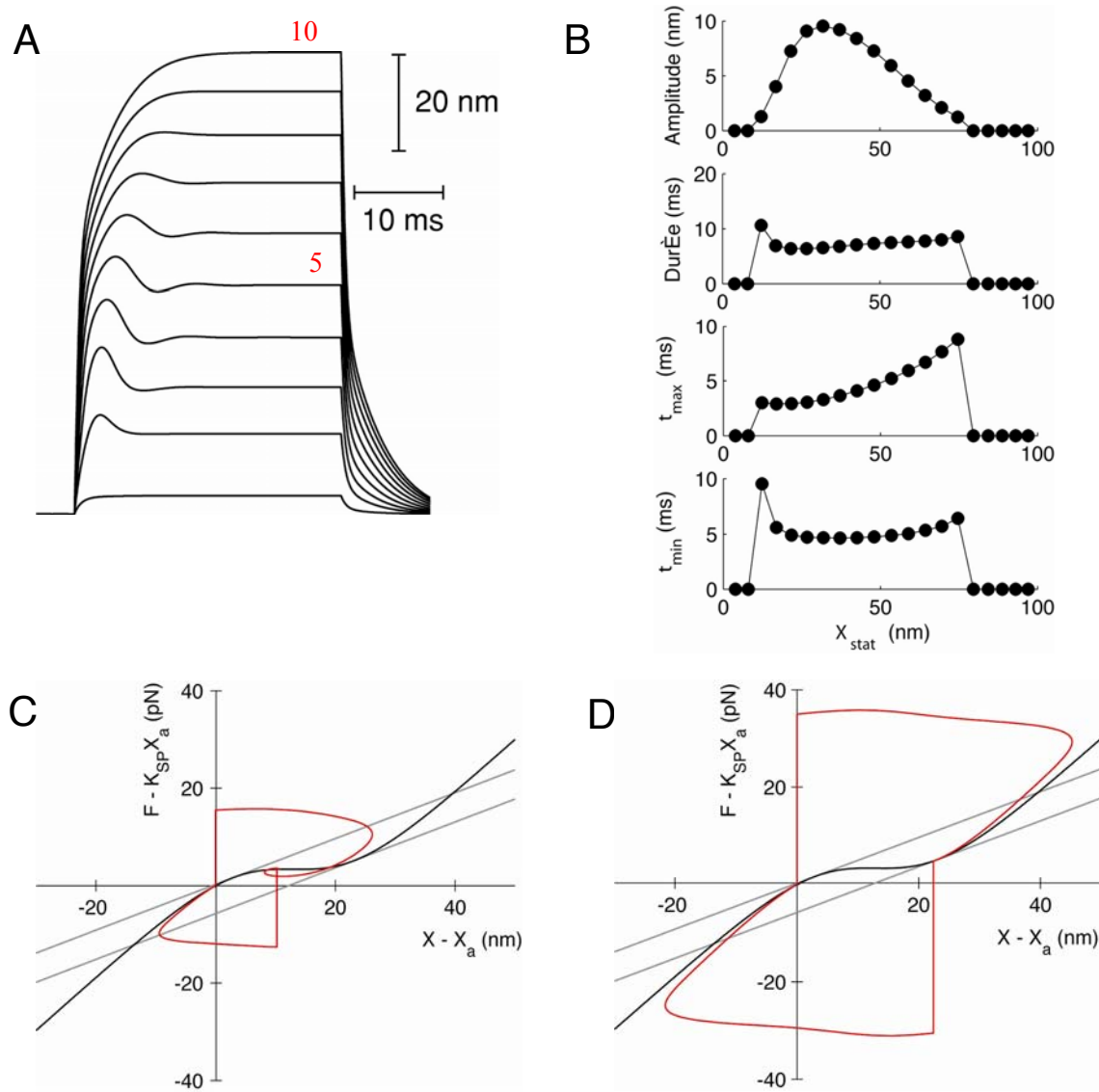


Figure IV-8 : Caractéristiques du twitch positif obtenu par simulation numérique. **A.** Réponse du système. On remarque l'existence d'un seuil de stimulation pour l'apparition d'un mouvement de recul et la disparition de ce mouvement de recul aux stimuli intenses. **B.** Amplitude, durée, position du maximum et du minimum en fonction du déplacement statique mesuré 100 ms après application du stimulus. **C.** Trajectoire dans le diagramme F/X pour la trace n°5 de la figure A. **D.** Trajectoire dans le diagramme F/X pour la trace n°10 de la figure A. On remarque que le point de fonctionnement du système en présence de l'échelon de force tout juste sorti du corridor qui délimite le lieu des points de faible pente, et pour lesquels un mouvement de recul peut être observé. Les simulations numériques utilisent ici les paramètres donnés dans l'annexe G, colonne H

Eunice Cheung et David Corey [Cheung & Corey, 2005] rapportent des expériences (décrites dans le paragraphe I.D.6.3) où le mouvement de recul du twitch est induit par une dépolarisation suivie d'une repolarisation brusque de leur corps cellulaire, qui entraîne l'entrée rapide de calcium dans le milieu

intracellulaire. Le tracé de l'amplitude du mouvement obtenu en fonction de l'intensité d'une force appliquée à la touffe ciliaire a la forme d'une cloche (Figure I-15.C), que nous avons cherché à reproduire par des simulations numériques. Le choix des paramètres K_{GS} , K_{SP} , D , N est contraint par les mesures que les auteurs ont réalisées, et que nous avons utilisées. Nous avons remarqué précédemment qu'une valeur de K_{ES} valant approximativement $2 \times K_{GS}$ était nécessaire, et nous avons choisi S et f_{\max} de telle manière à ce que la cellule soit dans la configuration « twitch positif » (voir l'annexe G, colonne K pour la valeur de ces paramètres). Les stimuli sont appliqués comme pour l'expérience relatée dans [Cheung & Corey, 2005] (Figure IV-9.A). On observe un mouvement de recul dans la réponse de la touffe ciliaire lorsque la trajectoire dans le diagramme F/X traverse, ici sous l'effet de la variation de S , la zone de raideur inférieure à K_{SP} , de manière similaire au twitch induit par une force extérieure décrit plus haut. La courbe de l'amplitude du mouvement de recul observé reproduit qualitativement celle observée expérimentalement (Figure IV-9.B). La grande valeur de K_{ES} conduit toutefois à trouver une gamme de forces pour lesquelles le twitch est observable plus restreinte que sur la figure 7 de [Cheung & Corey, 2005]. On note aussi que chaque mouvement de recul est dans nos simulations précédé par un mouvement positif dont l'amplitude croît avec F_{ext} . Comme remarqué précédemment, ceci est dû à une excursion de la trajectoire dans le diagramme F/X sur la branche pentue de la courbe F/X dont les abscisses sont plus positives que celles de la zone de raideur inférieure à K_{SP} . Les auteurs de [Cheung & Corey, 2005] observent également un mouvement positif précédant le mouvement de recul, mais celui-ci est attribué par les auteurs à un changement de conformation dépendant du potentiel (« flick ») d'un élément en série avec le complexe de transduction, et qui n'est pas inclus dans notre modèle.

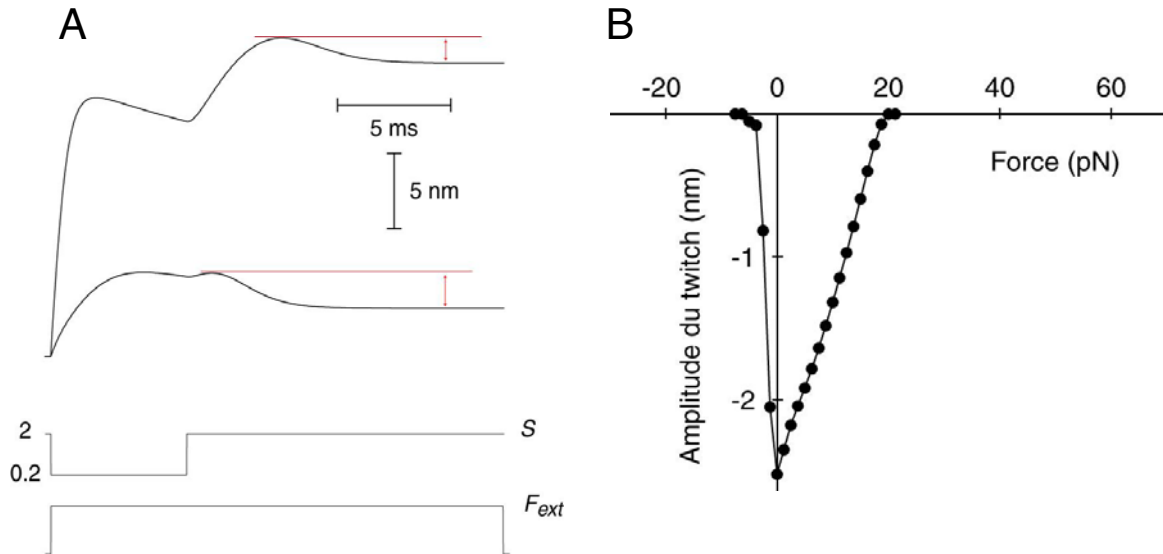


Figure IV-9 : Simulations numériques du twitch induit par une dépolarisation suivie d'une repolarisation. **A.** Mouvement ciliaire simulé, en reproduisant les expériences de [Cheung & Corey, 2005]. Le système dynamique est d'abord défléchi par une force extérieure (ici 1,25 pN et 7,5 pN) et dépolarisé (le paramètre S passe de 2 à 0,2). À $t=7$ ms, S reprend sa valeur initiale, et l'on suit le mouvement résultant. L'amplitude du twitch, lorsqu'il est observable, est définie comme étant l'écart entre le maximum local de X et le minimum qui suit. **B.** Amplitude du mouvement de recul résultant, selon la force extérieure appliquée. Paramètres de l'annexe G, colonne K.

A.2.6. Cinétique de l'adaptation

L'adaptation se manifeste par un courant de transduction qui décroît en amplitude après avoir atteint sa valeur maximale en réponse à un échelon de stimulation positive (voir paragraphe I.D). Cette décroissance est attribuée à la refermeture des canaux ouverts par la stimulation : la probabilité d'ouverture relaxe graduellement en direction de sa valeur au repos alors que la touffe ciliaire est soumise à une déflexion statique. Dans le cadre du modèle présenté dans au paragraphe I.F, la probabilité d'ouverture est déterminée par les variations temporelles de la variable $X - X_a$, ce qui implique que X_a et X contribuent tous deux au phénomène d'adaptation.

Dans le cas où la position X est imposée (par exemple dans les expériences où la touffe ciliaire est défléchie par un barreau rigide), l'adaptation est contrôlée par la relaxation de X_a . Dans ce cas simple, la refermeture des canaux est associée à un glissement de la courbe probabilité d'ouverture/déplacement, conséquence du mouvement du moteur de l'adaptation. En réponse à une marche de déplacement abrupte, l'équation I.14 indique que la relaxation de \bar{X}_a peut être décrite aux temps longs par une mono-exponentielle de temps caractéristique τ_a tel que

$$\tau_a = \frac{\lambda_a}{K_{GS} \left(1 - \frac{D}{\delta} \left(1 - \frac{S F_{\max}}{K_{GS} D} \right) P_o (1 - P_o) \right) + K_{ES}} \quad (\text{IV.6})$$

où P_o est la probabilité d'ouverture dans l'état stationnaire. La cinétique d'adaptation dépend donc du point de fonctionnement de la touffe ciliaire et de la rétroaction du calcium sur la force d'arrêt du moteur. Pour un point de fonctionnement porté par les branches linéaires de la relation F/X où $P_o = 0$ ou 1, l'adaptation est lente avec $\tau_a = \lambda_a / (K_{GS} + K_{ES}) \sim 8$ ms avec les paramètres de la figure IV-10. Dans la région non-linéaire avec $P_o = 50\%$, l'adaptation peut devenir rapide si $S > K_{GS} D / F_{\max}$. Comme S est proportionnel à la concentration extracellulaire de calcium, cette condition est favorisée lorsque les touffes ciliaires sont immergées dans un milieu à fort calcium. Toujours avec les paramètres de la figure IV-10, il vient $\tau_a \sim 1$ ms. On remarque que la rétroaction du calcium sur la force exercée par le moteur a pour effet de rendre le ressort de transduction effectivement plus raide : lorsque $S F_{\max} > K_{GS} D$,

$$\bar{K}_{GS} = K_{GS} \left(1 - \frac{D}{\delta} \left(1 - \frac{S F_{\max}}{K_{GS} D} \right) P_o (1 - P_o) \right) > K_{GS}$$

ce qui accélère la cinétique de relaxation du moteur. L'assouplissement dû à l'activation des canaux à lui l'effet inverse lorsque l'on ne tient pas compte de la dépendance en calcium de F_a ($S=0$).

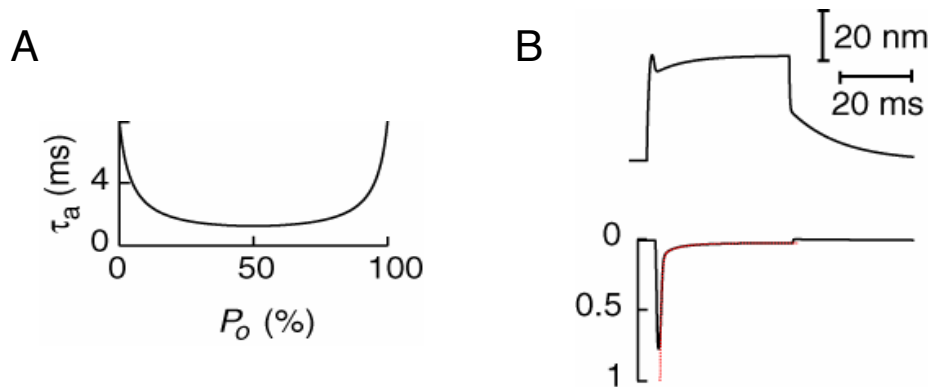


Figure IV-10 : Cinétique de l'adaptation. **A.** Valeur du temps de relaxation τ_a du moteur calculé à partir de l'équation IV.6, avec les paramètres donnés dans l'annexe G, colonne E. **B.** Pour les mêmes paramètres, simulation numérique de la réponse d'une touffe ciliaire à une marche de force de 40 pN. Haut : mouvement de la touffe ciliaire. Bas : Courant de transduction normalisé. En rouge : ajustement par la somme de deux exponentielles de constante de temps respectivement $\tau_1 = 5,0$ ms et $\tau_2 = 0,4$ ms et d'amplitude respectivement $A_1 = 0,08$ et $A_2 = 0,32$.

Lorsqu'une touffe ciliaire est stimulée par une marche de force et non de déplacement, la dynamique de X peut également participer à l'adaptation. Comme

les mouvements de la touffe ciliaire ont un temps caractéristique $\tau \sim \lambda/K_{SP} \sim 1$ ms, ils peuvent contribuer à la composante rapide de l'adaptation. En particulier, le mouvement rapide de recul que l'on observe lors du twitch occasionne une refermeture rapide des canaux (Figure IV-10.B), avec une cinétique comparable à celle observée expérimentalement et attribuée à l'adaptation rapide (voir le paragraphe I.D.6.1). L'existence d'une zone non linéaire dans la caractéristique mécanique force/déplacement de la touffe ciliaire couplée à un moteur dont la force d'arrêt est régulée par le calcium parviennent donc à rendre compte d'une cinétique d'adaptation rapide pour les déplacements dans la gamme de sensibilité mécano-électrique.

A.2.7. Complétude de l'adaptation

Il a été observé expérimentalement que l'adaptation n'est pas complète : en présence d'une déflexion statique X , le processus d'adaptation ne parvient pas à faire glisser la courbe de mécano-sensibilité P_o/X d'une quantité $X = X_a$ [Corey & Hudspeth, 1983a ; Crawford *et al*, 1989 ; Eatock *et al*, 1987 ; Hacohen *et al*, 1989 ; Howard & Hudspeth, 1988 ; Kros *et al*, 1992]. Pour rendre compte de ce phénomène, il a été proposé [Shepherd & Corey, 1994] qu'un élément élastique placé en parallèle du ressort de transduction et ancré au cytosquelette d'actine exerce une tension supplémentaire sur le moteur de l'adaptation. Dans la formulation de notre modèle, l'incomplétude de l'adaptation est traduite par l'existence d'un ressort d'extension de raideur K_{ES} dans l'équation I.14, générant une tension proportionnelle à l'extension $X_a - X_{ES}$.

Il est possible d'obtenir une estimation de la valeur de K_{ES} dans le cas simplifié à l'extrême où l'on néglige les effets non linéaires d'assouplissement de la touffe ciliaire due à la transduction (D petit), et où l'on ne tient pas compte de la dépendance en calcium de la force d'arrêt du moteur de l'adaptation ($S=0$) [Shepherd & Corey, 1994]. Le point d'ancrage du ressort d'extension est arbitrairement choisi pour que son extension soit nulle au repos. Dans ce premier état stationnaire, le moteur exerce une force d'arrêt F_a , contrebalancée par la tension dans le ressort de transduction. Si on applique ensuite une déflexion statique X^{stat} , on obtient au bout d'un temps long un nouvel état stationnaire pour lequel le moteur de l'adaptation s'est déplacé de X_a^{stat} , avec

$$X_a^{stat} = \frac{1}{1 + K_{ES} / K_{GS}} X^{stat} \quad (IV.7)$$

Expérimentalement, on trouve $X_a^{stat} \approx 0,8 X^{stat}$ [Shepherd & Corey, 1994], ce qui impose $K_{ES} = 0,25 \times K_{GS}$.

Dans le cas où l'on tient compte de la non-linéarité due à la transduction et de la dépendance en calcium de F_a , il faut faire appel à des simulations numériques. En

prenant les paramètres de la figure IV-8 (annexe G, colonne H, voir le paragraphe A.2.5), mais avec une raideur $K_{ES} = 0,25 \times K_{GS}$, on observe que l'adaptation est quasiment complète pour une large gamme de déplacements (Figure IV-11.A). D'autre part, le système dynamique exhibe un mouvement de recul en réponse à un stimulus positif pour des déflexions statiques allant jusqu'à 900 nm, alors qu'expérimentalement, la gamme pour laquelle le twitch est observé est de l'ordre de 100 nm (Figure III-3).

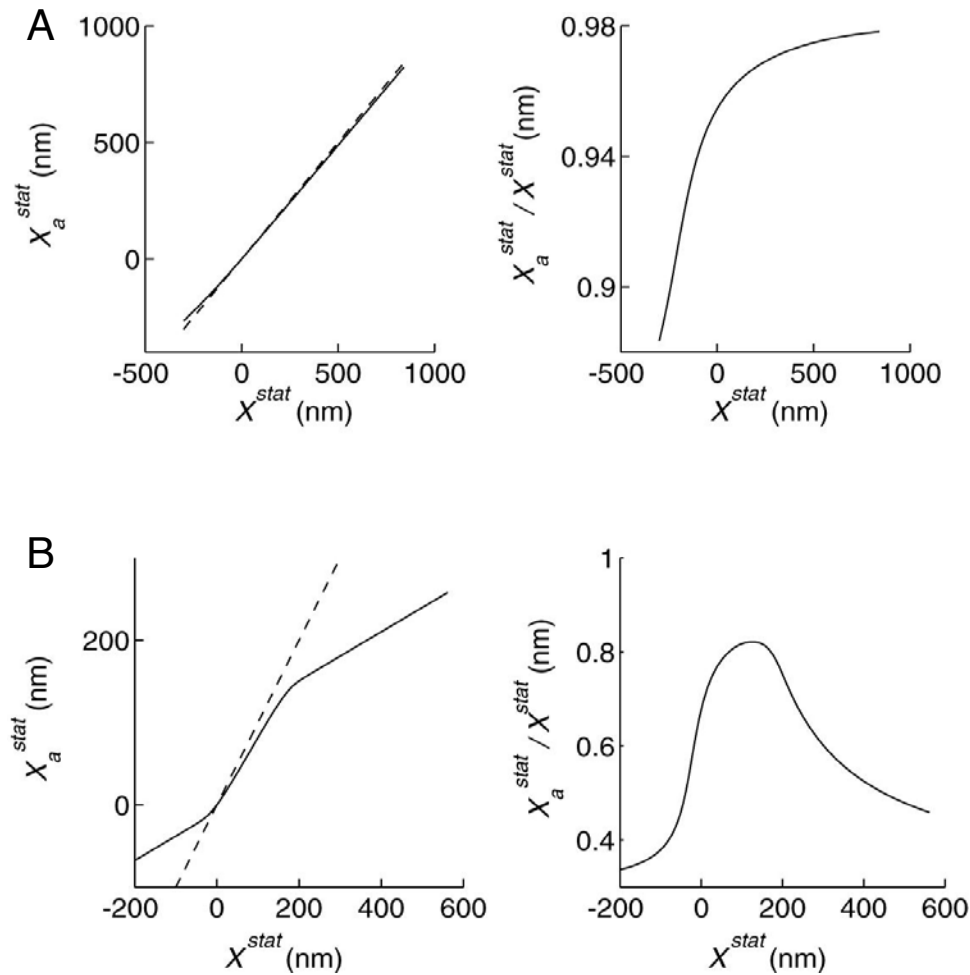


Figure IV-11 : Extension de l'adaptation selon la valeur de K_{ES} . Gauche : déplacement X_a du moteur dans l'état stationnaire en fonction de l'amplitude de la déflexion statique X ; en pointillé est tracé la droite de pente 1. Droite : Rapport X_a/X en fonction de la déflexion statique X . **A.** Simulations numériques réalisées avec les paramètres de l'annexe G, colonne H, mais en prenant $K_{ES} = 0,15$ pN/nm. **B.** Paramètres l'annexe G, colonne H, avec la valeur originale de $K_{ES} = 1,5$ pN/nm.

L'assouplissement dû à la transduction et de la dépendance en calcium de la force d'arrêt F_a ont donc une influence importante sur le degré de complétude de l'adaptation. Il n'est pas possible de calculer analytiquement X_a^{stat} dans l'état stationnaire en fonction de X^{stat} , mais pour illustrer la dépendance de la complétude de l'adaptation, on peut calculer la pente de la fonction $X_a^{stat} = f(X^{stat})$ tracée sur la

figure IV-11. En dérivant l'équation I.14 par rapport à X dans l'état stationnaire, il vient

$$\left. \frac{dX_a}{dX} \right|_{stat} = \frac{1}{1 + K_{ES} / \bar{K}_{GS}} \quad (IV.8)$$

avec

$$\bar{K}_{GS} = K_{GS} \left(1 - \frac{D}{\delta} \left(1 - \frac{SF_{\max}}{K_{GS}D} \right) P_o (1 - P_o) \right)$$

Pour les déflexions saturantes pour lesquelles $P_o = 0$ ou 1 , on retrouve le cas simplifié de l'équation IV.7. En périlymphe, le produit S est de l'ordre de $1-3$ et F_{\max} vaut ~ 50 pN. L'ordre de grandeur de K_{GS} est ~ 1 pN/nm, et D dans ce milieu n'excède pas 50 nm. Le rapport $SF_{\max}/K_{GS}D$ est donc dans ces conditions supérieur à 1 . L'équation IV.8 montre que le taux d'adaptation (défini en toute rigueur comme étant X_a^{stat}/X^{stat}) croît par rapport à sa valeur inférée par l'équation IV.7, dans la gamme où $P_o \sim 0,5$ à l'état stationnaire.

On peut expliquer qualitativement pourquoi la variation du taux d'adaptation est contrôlée par le rapport $SF_{\max}/K_{GS}D$, dans le cas où le système dynamique simulé est dans la configuration « twitch positif ». Au repos, les canaux de transduction sont presque tous fermés, et le ressort d'extension n'est pas mis sous tension. La force d'arrêt F_a ascensionnelle est contrebalancée par la tension dans le ressort de transduction qui tend à ramener le complexe de transduction vers la racine des stéréocils. Supposons dans un premier temps qu'il n'y a pas de rétroaction du calcium sur la force F_a du moteur, *i.e.* $S = 0$. L'équation IV.8 montre qu'on trouve alors un taux d'adaptation inférieur au cas linéaire pour les déplacements tels que $P_o \sim 0,5$. Il apparaît que l'assouplissement dû à la transduction défavorise la complétude de l'adaptation. En présence d'une déflexion positive statique, la touffe ciliaire atteint un nouvel état stationnaire caractérisé par une probabilité d'ouverture plus grande qu'au repos. La tension T_{GS} est maintenant contrebalancée par la force du moteur F_a et par la tension T_{ES} dans le ressort d'extension. Le complexe de transduction a glissé vers le bas ($X_a > 0$) et le ressort de transduction exerce sur lui une tension qui a tendance à le ramener en sa position au repos, dans la direction du sommet des stéréocils ($T_{ES} = -K_{ES} (X_a - X_{ES}) < 0$). Lorsque la probabilité d'ouverture passe d'une valeur quasi nulle à une valeur importante, le terme $-DP_o$ dans l'expression de $T_{GS} = -K_{GS} (X - X_a - DP_o)$ devient important, et la tension T_{GS} n'est pas aussi grande que dans le cas linéaire (où $D=0$). En conséquence, le glissement X_a est moins important que dans le cas linéaire.

Supposons maintenant que S est non nul et tel que $SF_{\max}/K_{GS}D > 1$. Comme la probabilité d'ouverture est supérieure à celle au repos en présence d'une déflexion statique positive, la concentration de calcium à proximité du moteur de l'adaptation est plus grande, et la force d'arrêt F_a qu'il exerce est en conséquence plus faible. Si l'effet du calcium sur la force d'arrêt F_a , caractérisé par la donnée de S , est

suffisamment important, la force d'arrêt F_a qui tend à contrer le glissement du moteur vers la racine des stéréocils est beaucoup plus faible (en valeur absolue) qu'au repos. Il est alors possible d'obtenir un nouvel état stationnaire où le glissement $X_a > 0$ est plus important que celui observé sur un système dynamique où $S=0$. En conséquence, on trouve un taux d'adaptation plus grand que celui observé sans rétroaction du calcium.

La prise en compte par nos stimulations de la non-linéarité due à la transduction et de la dépendance en calcium de F_a nécessite donc d'attribuer à K_{ES} une valeur différente de celle estimée par l'équation IV.7. Dans le paragraphe A.2.5, nous avons remarqué qu'il fallait prendre une valeur de K_{ES} d'environ 1,5 pN/nm pour rendre compte d'un taux d'adaptation de 80% dans la gamme des stimulations appliquées. Cette valeur donne de plus une gamme de déflexions pour lesquelles on observe un mouvement de recul en bonne adéquation avec celle obtenue expérimentalement (Figures III-3.C et IV-8.B). Le tracé des fonctions $X_a^{stat} = f(X^{stat})$ et $X_a^{stat} / X^{stat} = f(X^{stat})$ montre qu'il existe une gamme de déflexions statiques positives pour lesquelles le taux d'adaptation vaut 80%, et qui contient la gamme des déflexions pour lesquelles on observe du twitch (Figure IV-11.B). En dehors de cette gamme, les états stationnaires sont tels que $P_o \approx 0$ ou 1, et le taux d'adaptation est le même que dans le cas linéaire de l'équation IV.7, soit ici environ 30 %. On remarque que si le point de fonctionnement est tel que $P_o \approx 0$, la touffe ciliaire adaptera peu aux petits déplacements mais mieux aux plus grands déplacements (ce qui est observé par exemple dans le vestibule de la souris, voir la figure 2J de [Stauffer *et al*, 2005] et [Vollrath & Eatock, 2003]). L'inverse pourrait être observé si $P_o \approx 1$.

A.2.8. Twitch négatif

De manière similaire aux simulations numériques du twitch positif, une cellule possédant une région de raideur négative centrée en un déplacement négatif par rapport au point de fonctionnement (Figure IV-12.A) répond à un échelon de force négative par un mouvement similaire en amplitude et en cinétique à celui observé sur une cellule exhibant du twitch négatif (voir III.A.3). Ce qui a été dit sur le twitch positif s'applique ici, la situation étant symétrique. La cinétique comparativement plus lente qu'on observe pour le twitch négatif (comparer les figures IV-12.A et B) est due à des mouvements adaptatifs dont la cinétique est limitée par la vitesse ascensionnelle du moteur de l'adaptation dans une situation où la rétroaction du calcium sur la force des moteurs est faible (S petit).

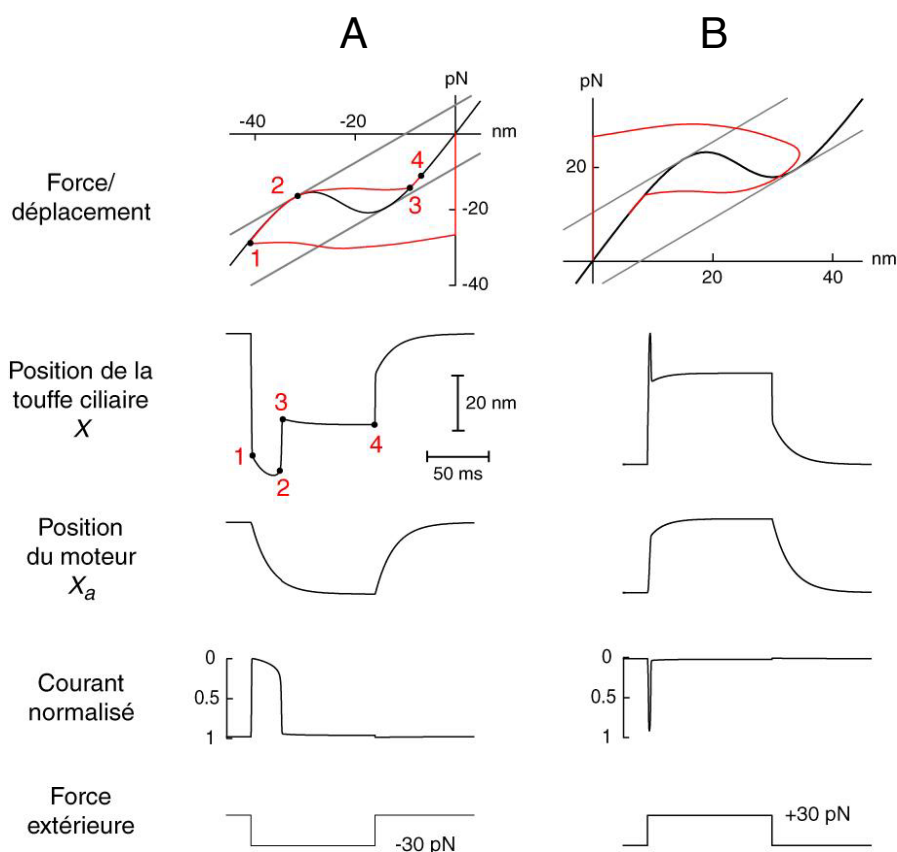


Figure IV-12 : Simulation numérique du twitch négatif et comparaison avec le twitch positif. **A.** Paramètres de l'annexe G, colonne C, en réponse à un échelon de force de -30 pN. Le mouvement de recul 2 \rightarrow 3 correspond ici à la traversée de la zone instable dans le diagramme F/X . Le mouvement se distingue également par une cinétique plus lente que celle observée pour le twitch positif. **B.** Pour illustrer ce fait, on trace ici la réponse du même système dynamique en configuration « twitch positif » (pour modifier le point de fonctionnement, on a prit $S=3$ et $f_{max}=300$ pN) à un échelon de force de $+30$ pN.

A.2.9. Comportements excitables chez la tortue

Des comportements excitables ont également été observé dans la cochlée de la tortue par Robert Fettiplace et ses collègues [Ricci *et al*, 2000], dans des conditions comparables (stimulation par une fibre souple et concentration de calcium plus élevée que celle *in vivo*), mais avec des mouvements ciliaires qui diffèrent de ceux observés chez la grenouille (Figure IV-2). Les valeurs des paramètres mécaniques utilisés par notre modèle sont moins contraints pour cet animal que pour la grenouille, mais des mesures de relations force/déplacement et de courant de transduction donnent une gamme de valeurs utilisables [Ricci *et al*, 2000 ; 2002].

Dans la figure 2.B de [Ricci *et al*, 2000], le rebond observé après une stimulation positive n'est pas suivi d'une excursion lente positive. On remarque de plus que des mouvements de recul sont observés pour des déplacements positifs et négatifs, donnant un double-twitch qui avait été occasionnellement observé chez la grenouille [Benser *et al*, 1996]. Ces deux observations suggèrent que le point de fonctionnement au repos de cette cellule est situé au sein de la zone plate de la courbe F/X , délimitée par le corridor de pente K_{SP} . Nos simulations numériques parviennent à reproduire la forme de la réponse ciliaire, en utilisant des paramètres semblables à ceux donnés dans [Ricci *et al*, 2000] (Figure IV-13). L'amplitude du mouvement de recul simulé est plus petite que celle observée expérimentalement, ce qui est sans doute dû à une sous estimation de la taille de la zone non linéaire avec nos paramètres.

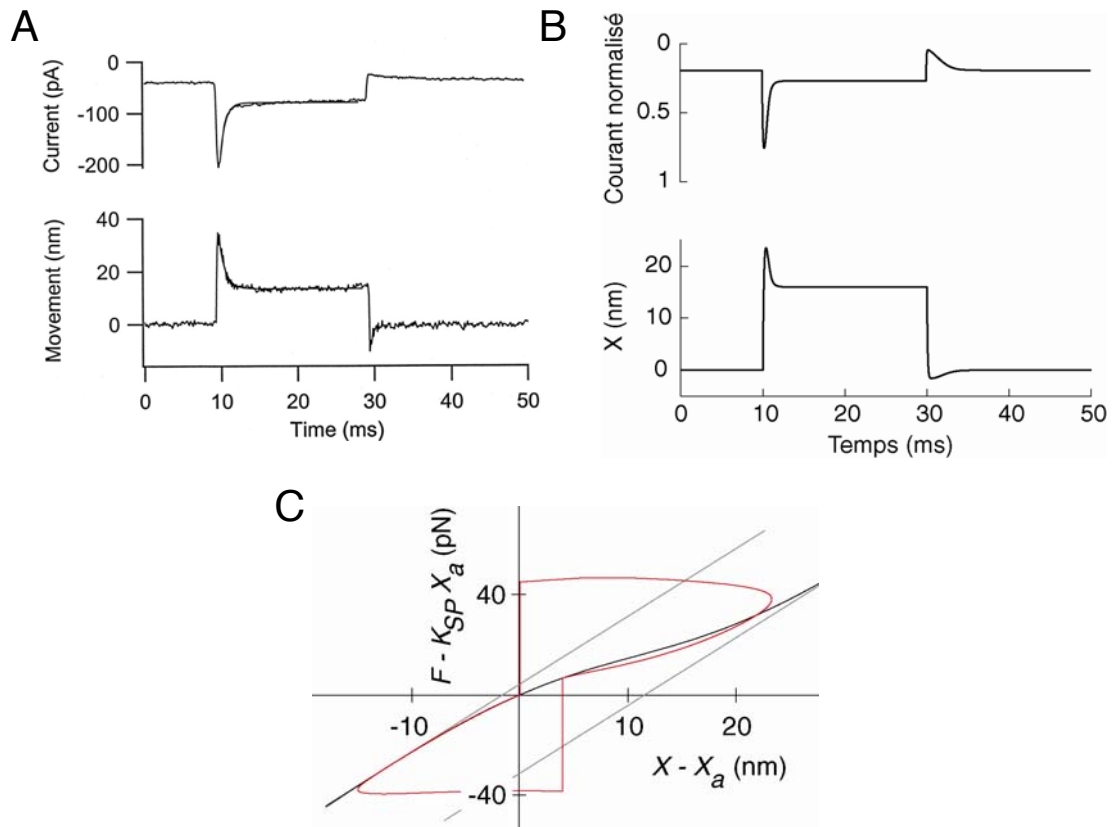


Figure IV-13 : Simulation numérique de la dynamique d'un premier mouvement ciliaire observé chez la tortue. **A.** Figure 2.B tirée de [Ricci *et al*, 2000]. **B.** Simulation numérique de cette dynamique, utilisant les paramètres de l'annexe G colonne I, en réponse à un échelon de force de 50 pN. Le courant normalisé a été tracé comme étant P_o , inversé pour mimer le courant de transduction. **C.** Trajectoire dans le diagramme F/X associée.

Dans la même publication (figure 2.A), les auteurs exhibent un twitch ou le mouvement de recul ramène la touffe ciliaire à une position plus négative que sa position initiale, puis le mouvement change à nouveau de polarité et la touffe

ciliaire relaxe lentement vers les X positifs (Figure IV-14.A). Comme signalé par les auteurs, cette réponse de la touffe ciliaire ressemble à un cycle d'oscillation amorti. En supposant que la courbe F/X possède de la raideur négative, mais est néanmoins dans état stable au repos, nous sommes parvenus à trouver des conditions qui reproduisent quantitativement la dynamique observée expérimentalement (Figure IV-14.B). Celles-ci sont très contraintes : il faut trouver des paramètres permettant l'obtention d'un minimum local après le rebond, pour une valeur de X négative. Une analyse quasi-statique dans le cas simplifié où la cellule ne possède pas de ressort d'extension montre que les conditions suivantes sont nécessaires :

- il faut une courbe F/X possédant de la raideur négative ;
- la marche de force doit être plus grande que l'ordonnée du maximum local de cette courbe ;
- le point de fonctionnement au repos doit être situé entre le premier point de tangence de la courbe F/X avec le corridor et ce maximum local ;

Les trois conditions sus-citées permettent d'assurer que la réponse de la cellule sera du type « twitch » avec un minimum local qui suit le mouvement de recul. D'autre part :

- l'ordonnée du minimum local de la courbe F/X doit être inférieure à 0 ;
- la 1^{ère} droite qui constitue le corridor coupe l'axe des forces en un certain point. L'échelon de force doit avoir une amplitude inférieure à son ordonnée.

Ces deux derniers impératifs assurent que la position de ce minimum sera en $X < 0$. Les stimulations de plus grandes amplitudes donnent la même forme du twitch, mais avec un minimum en $X > 0$, comme pour des twitches classiques. L'ensemble de ces conditions est suffisamment restrictif pour laisser très peu de marge dans le choix de la position du point de fonctionnement au repos. Ainsi, contrairement à tous les autres résultats numériques présentés ici, nous n'avons pas trouvé de situation où la prise en compte du bruit était satisfaisante : ce point de fonctionnement est si proche du maximum local de la courbe F/X que les forces stochastiques suffisent à lui faire traverser la zone instable au repos, donnant lieu à des oscillations bruitées même sans stimulation. De telles oscillations n'ont pas été observées sur cette cellule. Il est possible que les forces stochastiques telles que nous les décrivons dans nos simulations aient une amplitude trop grande pour les cellules ciliées de la tortue. On peut également signaler que notre modèle du canal à deux états contraint fortement la forme de la courbe force/déplacement, et que la prise en compte d'états supplémentaires offrirait probablement une gamme de paramètres plus large. L'existence d'une zone de raideur négative dans la courbe F/X reste toutefois une condition impérative pour simuler cette dynamique, ce qui suggère qu'une telle propriété mécanique existe chez la tortue, comme pour la grenouille. De manière cohérente, les mêmes auteurs ont, lors de précédentes

expériences, observé occasionnellement des oscillations spontanées au sein de ce même organe [Crawford & Fettiplace, 1985].

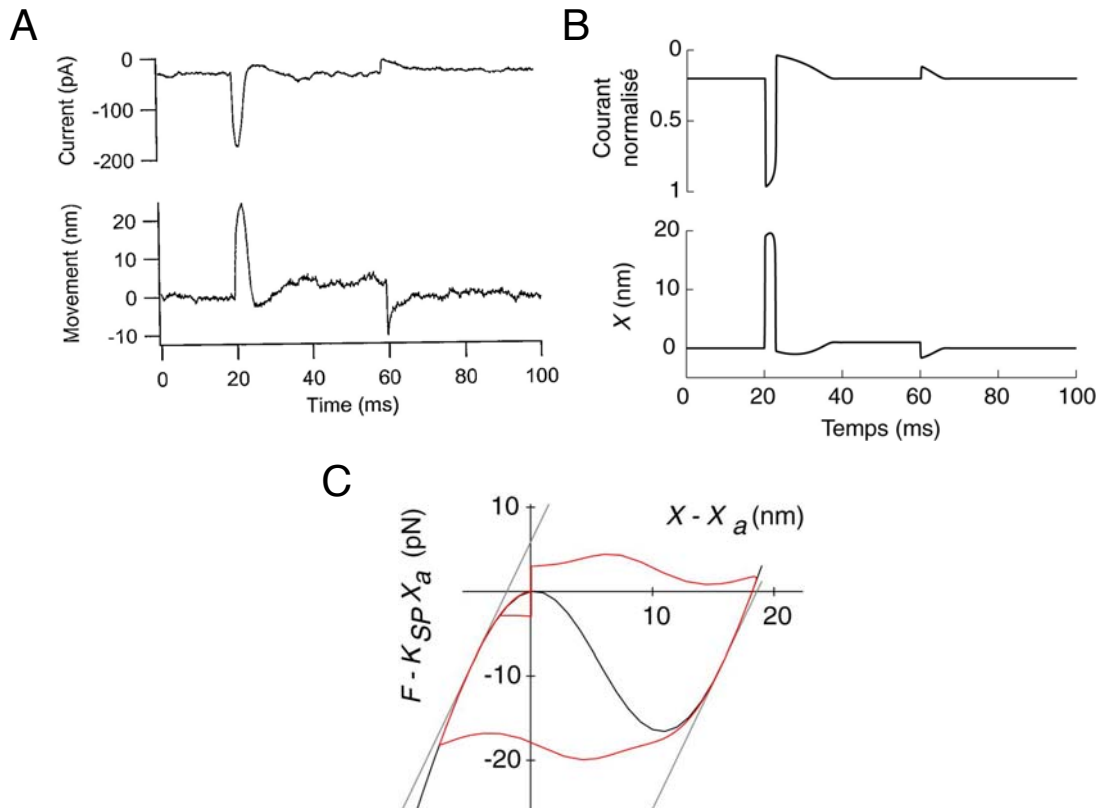


Figure IV-14 : Simulation numérique de la dynamique d'un second mouvement actif observé chez la tortue. **A.** Figure 2.A tirée de [Ricci et al, 2000]. **B.** Simulation numérique de cette dynamique, utilisant les paramètres de l'annexe G colonne J, en réponse à un échelon de force de 3 pN. **C.** Trajectoire dans le diagramme F/X associée.

B. Effet du calcium sur la mécanique ciliaire

B.1. Effets du calcium sur les propriétés mécaniques statiques

Deux types d'expériences nous ont permis de mettre en évidence une déformation de la caractéristique F/X avec le calcium. Lorsque la concentration de calcium à proximité d'une touffe ciliaire passe de $\sim 250 \mu\text{M}$ à $\sim 3 \text{ mM}$, l'ajustement des courbes F/X par l'équation I.6 (qui donne les paramètres K_∞ , N et Z) pour la cellule de la figure III-20 révèle que cette caractéristique se déforme principalement au travers d'une augmentation d'environ 50% du paramètre K_∞ (voir le paragraphe III.D.2). Cette déformation est accompagnée d'un glissement du centre de la zone

non linéaire de ~ 22 nm. Ce glissement est suffisant pour induire un changement de classe de mouvement actif. À $250 \mu\text{M}$, la courbe F/X possède une région de raideur négative au sein de laquelle se trouve le point de fonctionnement. On observe donc pour cette cellule des oscillations spontanées. Pour $[\text{Ca}^{2+}] \approx 3 \text{ mM}$, la caractéristique F/X possède une zone non linéaire plate, centrée en un déplacement positif par rapport au point de fonctionnement : la touffe ciliaire est stable et en situation favorable pour observer du twitch positif. Il nous a jusqu'à présent été impossible de mesurer de la raideur négative lorsque les touffes ciliaires sont immergées dans un milieu riche en Ca^{2+} . De manière consistante, les oscillations spontanées – qui dépende de l'existence d'une zone de raideur négative dans la courbe F/X – sont observées beaucoup plus fréquemment lorsque les touffes ciliaires sont immergées dans un milieu dans lequel $[\text{Ca}^{2+}] = 250 \mu\text{M}$ que lorsque $[\text{Ca}^{2+}] = 4 \text{ mM}$. Il est possible, à la vue de nos observations, que le Ca^{2+} tende à affaiblir l'effet de l'assouplissement qui résulte de l'activation des canaux de transduction et donc stabilise la touffe ciliaire.

Les effets du calcium sur l'amplitude des oscillations spontanées de la touffe ciliaire nous donne un autre moyen d'évaluer comment le calcium affecte la mécanique ciliaire (voir le paragraphe III.B.2). Dans le cadre de notre modèle (Figure IV-1), le saut abrupt positif ou négatif observé lors de la phase rapide des oscillations spontanées correspond à la traversée de la zone instable de la courbe F/X .

Dans la limite où le moteur (X_a) relaxe beaucoup plus lentement que la touffe ciliaire (X), le point de fonctionnement de la cellule est constamment porté par la courbe F/X au cours de sa dynamique, du moins tant que la cellule opère le long des branches stables de cette courbe. Chaque saut abrupt correspond au passage, à force extérieure constante, d'un extremum local de la courbe F/X à un point de la branche stable voisine de cette courbe (du point 1 au point 2 ou du point 3 au point 4 sur la courbe IV-1). La différence des abscisses de ces points donne une estimation de l'amplitude des sauts. Ces points sont tels que

$$\begin{aligned} F_1 &= K_{GS}(\bar{X}_1 - \bar{X}_a - DP_{o1}) + K_{SP} \bar{X}_1 \\ F_2 &= F_1 = K_{GS}(\bar{X}_2 - \bar{X}_a - DP_{o2}) + K_{SP} \bar{X}_2 \end{aligned}$$

$$\text{d'où} \quad \Delta X = \bar{X}_2 - \bar{X}_1 = \frac{DK_{GS}}{K_{GS} + K_{SP}} \Delta P_o \quad (\text{IV.9})$$

avec $\Delta P_o = P_{o2} - P_{o1}$.

Des mesures de courbes F/X réalisées sur la cellule de la figure III-10.D lorsque $[\text{Ca}^{2+}]$ n'est pas modifiée par iontophorèse indiquent que ΔP_o devrait valoir environ 80% si le point de fonctionnement de la touffe ciliaire colle aux branches stables de la courbe F/X (P_o varie entre 18 % et 98 % lors du saut abrupt positif). Avec les valeurs inférées $K_\infty = 0,677 \pm 0,022$ pN/nm, $N = 60,1 \pm 1,5$ et

$Z = 0.550 \pm 0.046$ pN (moyenne \pm erreur standard, $n = 4$), il vient (en prenant K_{SP} constant et égal à $0,200$ pN/nm) $d = 9,9 \pm 1,5$ nm et $k_{GS} = 0,390 \pm 0,027$ pN/nm, soit $\Delta X = 39,1$ nm. Comme dans nos équations, la courbe F/X est symétrique, on prédit la même amplitude pour les sauts négatifs. Ces valeurs sont en accord quantitatif avec les mesures expérimentales sur les sauts négatifs ($a_- = 41 \pm 2$ nm), ce qui n'est pas le cas des sauts positifs dont l'amplitude est plus importante ($a_+ = 49 \pm 2$ nm).

L'équation IV.9 indique que ΔX est une fonction croissante de $D=d/\gamma$ et une fonction faiblement croissante de K_{GS} . Si l'on fait l'approximation que ΔP_o et le rapport $K_{GS}/(K_{SP}+K_{GS})$ dépendent peu du calcium, et que l'on impute les variations d'amplitude mesurées sur la figure III-10 ($\sim 20\%$) à une variation de d , on peut avoir un ordre de grandeur de la dépendance maximale de d en la concentration $[Ca^{2+}]$. Pour la cellule de la figure III-10.D, sa valeur varie de ~ 10 nm à ~ 7 nm lorsque la concentration $[Ca^{2+}]$ passe de ~ 250 μ M à ~ 2 mM

Le modèle que nous utilisons pour décrire le comportement d'une touffe ciliaire suppose qu'aucun des paramètres K_{GS} , K_{SP} , N , D , ... en dehors de la force d'arrêt F_d ne dépend du calcium. C'est-à-dire que ces paramètres ne varient pas

- lorsque la concentration extracellulaire en calcium est modifiée dans le milieu ionique dans lequel baignent les touffes ciliaires, par exemple par iontophorèse ;
- lorsque la concentration intracellulaire du calcium varie à proximité du complexe de transduction lors d'une déflexion qui ouvre ou ferme transitoirement les canaux.

Cette description ne permet donc pas de rendre compte des déformations de courbes F/X mesurées directement ou inférées. Les déformations observées sont suffisamment faibles néanmoins pour que l'on puisse considérer que l'effet principal du Ca^{2+} soit de faire glisser le point de fonctionnement de la touffe ciliaire dans sa caractéristique F/X . Pour des variations de la concentration en calcium sur un ordre de grandeur (250 μ M – 2 mM), les caractéristiques cinétiques des mouvements actifs sont en effet affectées beaucoup plus dramatiquement que les amplitudes (Figures III-9 et III-10) : la durée de la phase lente positive est divisée par ~ 10 pour toutes les cellules testées sur cette gamme de concentration, alors que les amplitudes des sauts abrupts de ces oscillations diminuent au plus de 30% (Figure III-10). Ceci permet d'expliquer pourquoi notre modèle simple permet de rendre compte de manière satisfaisante des effets du Ca^{2+} sur les mouvements actifs (voir plus loin le paragraphe B.4) : le glissement de la caractéristique F/X induit par le calcium permet par exemple à lui seul d'interpréter les changements de classe de comportement actif ainsi que les effets cinétiques à l'intérieur d'une classe.

B.2. Glissement des courbes F/X

Nous avons mis en évidence dans le paragraphe III.D.1 le glissement des courbes F/X dû à une variation de $[Ca^{2+}]$. Sur la figure III-18.A et III-19, les courbes semblent se déplacer selon une droite de pente K_{∞} , alors que, comme nous l'avons montré dans le paragraphe I.G.2, notre modèle prédit que, dans un repère (F, X) muni d'une origine absolue, ces courbes se déplacent selon une droite de pente K_{SP} . Cette apparente contradiction est le résultat du protocole utilisé lors de cette expérience : avant chaque mesure d'une courbe F/X , le courant de iontophorèse I_i est envoyé, et la touffe ciliaire non couplée à la fibre de stimulation vient se placer en $X=X_i$. La fibre, non défléchie, est alors couplée à la cellule en cette position, qui sera par construction l'origine du graphe (F, X) pour la mesure de la courbe force/déplacement. Pour pouvoir mesurer le glissement F/X suivant l'axe des forces (et ainsi obtenir une estimation de K_{SP}), il aurait fallu conserver la mesure de la position absolue de la touffe ciliaire, ce qui, à cause de la dérive, est particulièrement difficile sur la durée que nécessite la mesure d'une série.

On peut utiliser les données de la figure III-18 et les équations I.9, I.10 et I.12 pour estimer la dépendance de la rétroaction S en le calcium extracellulaire. On définit comme référence absolue les positions stationnaires X de la touffe ciliaire et X_a du moteur de l'adaptation lorsque la touffe ciliaire est libre ($F_{ext} = 0$) et non soumise à un courant de iontophorèse (I a la valeur du courant de retenue). On a alors $S = S_0$ et $X_{ES} = 0$ (X_{ES} est choisi tel que le ressort d'extension ne soit pas mis sous tension dans cet état stationnaire particulier). En présence du courant iontophorétique I_i , la touffe ciliaire et le moteur se déplacent en de nouvelles positions stationnaires X_i et X_{ai} . Le paramètre S vaut alors S_i . Les couples $X = 0$, $X_a = 0$ (pour $S = S_0$) et $X = X_i$, $X_a = X_{ai}$ (pour $S = S_i$) sont des états stationnaires. D'autre part, dans le cas particulier de la cellule de la figure III-18, ces points obtenus pour les différents courants de iontophorèse utilisés sont tels que l'on peut approximer $P_o \approx 1$. L'équation I.9 permet d'affirmer que

$$\begin{cases} 0 &= -K_{GS}(X_r - D/2) + K_{SP} X_{SP} \\ 0 &= -K_{GS}(X_i - X_{ai} + X_r - D/2) - K_{SP}(X_i - X_{SP}) \end{cases}$$

$$\text{soit} \quad 0 = K_{GS}(X_i - X_{ai}) + K_{SP} X_i \quad (\text{IV.10})$$

De même, l'équation I.10 donne

$$\begin{cases} 0 &= K_{GS}(X_r - D/2) + F_{\max}(S_0 - 1) \\ 0 &= K_{GS}(X_i - X_{ai} + X_r - D/2) - K_{ES} X_{ai} + F_{\max}(S_i - 1) \end{cases}$$

$$\text{soit} \quad 0 = K_{GS}(X_i - X_{ai}) - K_{ES} X_{ai} + F_{\max}(S_i - S_0) \quad (\text{IV.11})$$

En combinant cette dernière équation avec la précédente, il vient

$$(X_{ai} - X_i) = \frac{K_{SP}}{K_{GS} K_{SP} + K_{GS} K_{ES} + K_{SP} K_{ES}} F_{\max} (S_i - S_0) \quad (IV.12)$$

X_i est la position stationnaire de la touffe ciliaire lorsque $S=S_i$, mesurée par rapport à sa position lorsque $S=S_0$, de même pour X_{ai} . Comme remarqué précédemment, X_i n'est pas mesuré dans nos expériences, car pour mesurer une courbe force/déplacement, nous replaçons le point de force nulle en l'origine du graphe F, X . Par contre, nos expériences donnent accès à la valeur de X_{0i} la position du centre de la zone non-linéaire de la relation F/X , mesurée par rapport à cette position stationnaire (soit sur la figure III-18.A par rapport à l'origine du graphe). Lorsque la touffe ciliaire, soumise au courant de iontophorèse i , est brutalement défléchie de la quantité X_{0i} par rapport à X_i (suffisamment rapidement pour que le moteur d'adaptation ne quitte pas la position X_{ai}), la probabilité d'ouverture prend la valeur 1/2. L'équation I.12 donne alors

$$0 = -\frac{Z}{k_B T} \left\{ X_i + X_{0i} + X_r - \frac{\Delta\mu}{Z} - X_{ai} \right\}$$

soit, avec l'équation IV.12,

$$X_{0i} = \frac{\Delta\mu}{Z} - X_r + \frac{K_{SP}}{K_{GS} K_{SP} + K_{GS} K_{ES} + K_{SP} K_{ES}} F_{\max} (S_i - S_0) \quad (IV.13)$$

Dans le cadre de l'approximation $P_o(X=X^{stat}) \approx 1$, notre modèle prévoit donc que les courbes F/X sont centrée en une position X_0 qui est une fonction linéaire croissante de S_i . Comme S est proportionnel à la concentration de calcium extracellulaire, $S = \beta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$, on peut écrire

$$X_0 = \frac{K_{SP}}{K_{GS} K_{SP} + K_{GS} K_{ES} + K_{SP} K_{ES}} F_{\max} \beta \left(\frac{\zeta_{\text{Ca}}}{4\pi F D_{\text{Ca}} r} I_{\text{Ca}} + 250 \mu\text{M} \right) + C^{\text{te}}$$

où ζ_{Ca} est la transférance du calcium pour la micropipette utilisée, F est le faraday, D_{Ca} (pris égal à $7,9 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) est le coefficient de diffusion du calcium dans l'endolympe-NMDG, r la distance de la micropipette à la touffe ciliaire et I_{Ca} le courant de iontophorèse, mesuré par rapport au courant de retenue. Une étude de la fonction de réponse d'une touffe ciliaire oscillante a montré que F_{\max} était de l'ordre de 50 pN [Nadrowski *et al*, 2004]. Nous utiliserons ici la même valeur, en supposant que la force F_{\max} , proportionnelle au nombre N_a de myosines, ne varie pas avec le calcium. Pour la cellule étudiée (Figure III-18), $r \approx 2,5 \mu\text{m}$, $K_{GS} \approx 0,316 \text{ pN/nm}$ et avec $K_{SP} = 0,2 \text{ pN/nm}$, $K_{ES} \approx K_{GS}$, $\zeta_{\text{Ca}} = 12\%$, il vient $\beta \approx 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Notre modèle est donc en accord avec l'observation expérimentale (Figure III-18) selon laquelle le glissement des courbes F/X est une fonction linéaire du courant iontophorétique dans des conditions où $P_o \sim 1$. Ce résultat nous conforte a

posteriori sur une hypothèse forte du modèle, à savoir que la force des moteurs varie linéairement avec la concentration de calcium (équation I.11).

De plus, on peut utiliser ce calcul pour obtenir un ordre de grandeur de dF_a/dC la dépendance en calcium de la force exercée par les myosines du moteur de l'adaptation. On rappelle que $S = -\frac{C_M}{F_{\max}} \frac{dF_a}{dC} \Big|_{ref}$. La concentration C_M est la concentration intracellulaire en calcium mesurée à proximité du moteur de l'adaptation atteinte lorsque tous les canaux sont maintenus ouverts. Cette concentration est supposée proportionnelle à la concentration extracellulaire : $C_M = \chi [Ca^{2+}]_{ext}$. Les auteurs de [Martin *et al*, 2003] donnent une estimation théorique du facteur de proportionnalité : $\chi \approx 5.10^{-2}$. En comparant avec l'expression de $S = \beta [Ca^{2+}]_{ext}$ trouvée pour la cellule de la figure III-18 et toujours en prenant $F_{\max} \approx 50$ pN, il vient

$$\frac{dF_a}{dC} \approx 1 \text{ pN} \cdot \mu\text{M}^{-1}$$

B.3. Mouvements induits par un échelon de $[Ca^{2+}]$

B.3.1. Résultats contradictoires chez la grenouille et la tortue

Un moyen d'observer les effets du calcium sur les propriétés de la touffe ciliaire consiste à dépolariser ou hyperpolariser transitoirement une cellule ciliée et à suivre le mouvement résultant de la touffe ciliaire. Une dépolarisation correspond à une diminution du gradient électrochimique du calcium, ce qui a pour conséquence de diminuer l'influx de Ca^{2+} dans la cellule et donc sa concentration intracellulaire. Une hyperpolarisation a les effets inverses.

Il a été reporté [Assad & Corey, 1992], dans le cas de cellules ciliées du saccule de la grenouille taureau et complètement immergées dans la périlymphe artificielle ($[Ca^{2+}] = 4$ mM), que la touffe ciliaire présente une excursion lente vers les X négatifs en réponse à une dépolarisation du corps cellulaire (Figure IV-15.A). Ce mouvement est ajustable par une exponentielle avec une constante de temps de 117 ms pour la dépolarisation et 22 ms pour la repolarisation. Les auteurs attribuent cette dynamique à l'activité du moteur de l'adaptation lente : lorsque l'on dépolarise la cellule, la concentration intracellulaire en calcium diminue à proximité des myosines, celles-ci sont capables de générer une force plus grande, et se déplacent en direction du sommet des stéréocils en consommant de l'ATP. Ce mouvement ascensionnel du moteur de l'adaptation crée une augmentation de la tension dans les liens de bout de cils et se traduit donc par un déplacement négatif de la touffe ciliaire. À la repolarisation, la concentration initiale est restaurée, les myosines se décrochent des filaments d'actine et glissent vers la racine des

stéréocils. Comme l'ascension implique pour chaque moteur de parcourir le cycle ATPase, elle apparaît plus lente que la descente, qui est un glissement passif sous l'effet de la tension dans les ressorts de transduction.

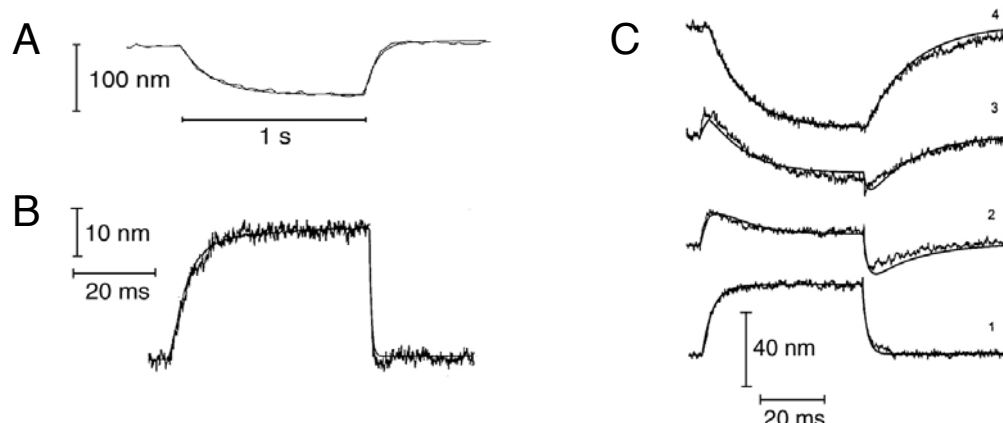


Figure IV-15 : **A.** Mouvement observé lors d'une dépolarisation de -80 mV à $+60$ mV pour une cellule ciliée du saccule de la grenouille taureau [Assad & Corey, 1992]. **B.** Mouvement observé pour une cellule de la cochlée de la tortue [Ricci et al, 2000]. **C.** Même expérience qu'en B, mais en biaisant la position de la touffe ciliaire par des offsets croissants de la trace 1 à 4 [Ricci et al, 2002].

Lorsque la même expérience est réalisée sur une cellule ciliée de la cochlée de la tortue [Ricci et al, 2000], on observe un mouvement ciliaire de polarité opposée avec une cinétique bien plus rapide, caractérisée par une constante de temps de l'ordre de la milliseconde (Figure IV-15.B). Le mouvement à la dépolarisation est également plus lent que celui à la repolarisation (0,5 ms). Les auteurs invoquent l'action directe du calcium sur le complexe de transduction, stabilisant l'état fermé du canal, pour expliquer cette contradiction : si le calcium peut refermer les canaux lorsqu'on augmente sa concentration, il doit aussi pouvoir les ouvrir quand on l'abaisse. Cette ouverture produite par une dépolarisation vient relaxer les ressorts de transduction, et la touffe ciliaire se déplace vers les X positifs.

Lorsque la même expérience est répétée [Ricci et al, 2002] mais en biaisant la position de la touffe ciliaire grâce à une fibre souple, la réponse observée change radicalement de dynamique. Lorsque l'on ajoute un offset croissant à sa position initiale, l'excursion rapide vers les X positifs devient biphasique puis négative avec une cinétique plus lente (Figure IV-15.C). La trace 1 de la figure C a une polarité opposée à celle de la trace 4, et est plus rapide que cette dernière. Les traces intermédiaires exhibent un changement de polarité au cours du mouvement et une dynamique complexe. Les auteurs suggèrent que l'observation de deux composantes différentes tant en polarité qu'en cinétique dans le mouvement de la touffe ciliaire induit par dépolarisation est la signature de l'existence de deux mécanismes d'adaptation distincts. Mais dans les détails, le changement de polarité observé,

ainsi que l'origine de la discordance entre les résultats observés chez la grenouille et la tortue, demeurent inexpliqués à ce jour.

Chez la grenouille, nous avons mis en évidence d'une part que le mouvement d'une touffe ciliaire en réponse à un échelon de $[Ca^{2+}]$ pouvait avoir les deux polarités (voir le paragraphe III.E.1), et d'autre part que la polarité de cette réponse pouvait être inversée en appliquant à sa position des biais statiques (voir le paragraphe III.E.2), comme observé chez la tortue. Nous utilisons le modèle présenté précédemment afin de proposer une interprétation des mouvements observés.

B.3.2. Modification du point de fonctionnement par l'application de biais statiques à la position de la touffe ciliaire

Dans le cadre de notre modèle, les changements de comportement dynamique induit par un biais de la position au repos de la touffe ciliaire trouvent leur origine dans le fait que l'adaptation est incomplète. Si celle-ci était complète, les biais statiques que l'on impose à une touffe ciliaire avant de les stimuler par iontophorèse demeureraient sans effet sur le point de fonctionnement de la cellule : la probabilité d'ouverture et la position sur la courbe F/X seraient les mêmes quelle que soit la déflection statique imposée à la touffe ciliaire, et des stimulations identiques auraient des conséquences identiques, ce qui n'est pas le cas. Il faut donc supposer que ces biais modifient le point de fonctionnement de la touffe ciliaire, ce que notre modèle décrit par l'existence d'un ressort d'extension K_{ES} .

Lorsque l'on applique un biais sous la forme d'une déflection statique X_s à la touffe ciliaire, la courbe probabilité d'ouverture/déplacement ne glisse pas de $X_a = X_s$. Le moteur de l'adaptation glisse d'une distance inférieure égale à environ 80% du biais imposé (voir le paragraphe I.D.1) et cette courbe se déplace donc le long de l'axe des abscisses d'une distance αX_s (avec $\alpha = 0,8$ le taux d'adaptation mesuré chez la grenouille [Shepherd & Corey, 1994]). Il en résulte que pour des biais positifs, la probabilité d'ouverture au repos sera plus grande. Il en est de même pour la courbe F/X : le point initialement en $X = 0$ sera positionné en présence du biais non en X_s mais en αX_s . Ce glissement de la courbe F/X se fait selon une pente égale à K_{SP} (voir le paragraphe I.G.2). Comme la touffe ciliaire est en $X = X_s$, son point de fonctionnement en présence du biais sera décalé d'une abscisse $\Delta X = (1-\alpha) X_s$ sur cette courbe (Figure IV-16).

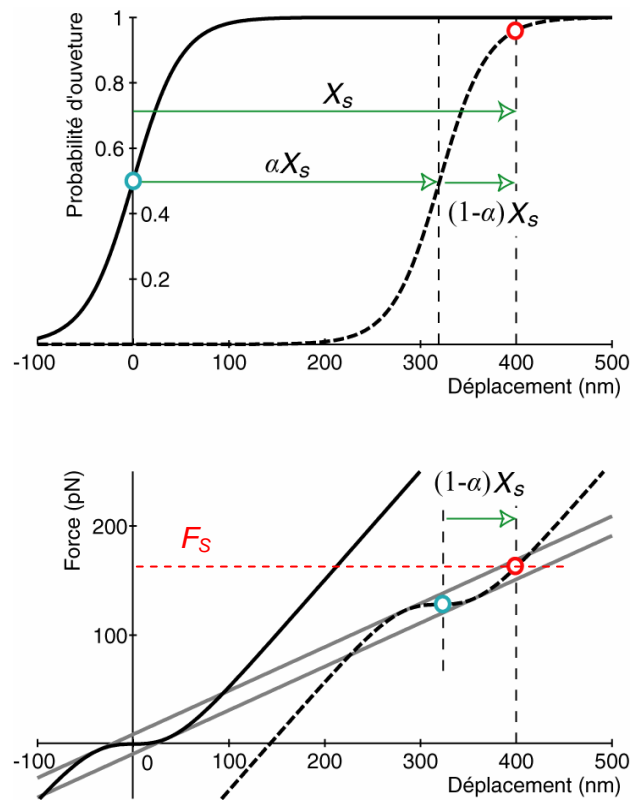


Figure IV-16 : **A.** Modification du point de fonctionnement en présence d'une force statique F_s qui impose un biais statique d'amplitude X_s à la position de la touffe ciliaire. Comme l'adaptation est incomplète, les courbes P_o/X et F/X ne glissent que de αX_s , ce qui a pour conséquence sur cet exemple de faire passer la probabilité d'ouverture de 50% à plus de 90%. Le point de fonctionnement quitte donc la zone plate de la caractéristique F/X de la touffe ciliaire pour une région plus pentue. Les courbes grises sont les droites de pente K_{SP} tangentes en la courbe F/X , et selon lesquelles celle-ci glisse lorsque le moteur de l'adaptation se déplace.

B.3.3. Réponse à une modification transitoire de $[Ca^{2+}]$

Comme on l'a vu dans les paragraphes III.D.1 et IV.B.2, l'effet principal d'un changement de $[Ca^{2+}]$ est de faire glisser les courbes F/X . Dans le cadre de notre modèle, ce glissement se fait selon une pente K_{SP} et est le reflet du mouvement adaptatif X_a du moteur de l'adaptation.

Si l'on suppose que la caractéristique F/X possède une pente en tout point positive, le mouvement δX de la touffe ciliaire observé lorsque le moteur de l'adaptation se déplace de δX_a est donné par l'équation IV.1. Considérons le cas d'une touffe ciliaire non soumise à une force extérieure et à proximité de laquelle on éjecte un chélateur du calcium par iontophorèse. La concentration en calcium extracellulaire et intracellulaire décroît en conséquence et la force d'arrêt du moteur

augmente. Il s'ensuit un mouvement $\delta X_a < 0$. Si le point de fonctionnement de la cellule est porté par une partie de la courbe F/X de pente plus grande que K_{SP} , le mouvement de la touffe ciliaire δX observé est, en vertu de l'équation IV.1, dans la direction négative (Figure IV-17.A). Si ce point de fonctionnement est porté par la zone non linéaire de raideur inférieure à K_{SP} , le mouvement δX est dans la direction positive (Figure IV-17.B). L'inverse est observé lorsque l'on éjecte du calcium par iontophorèse.

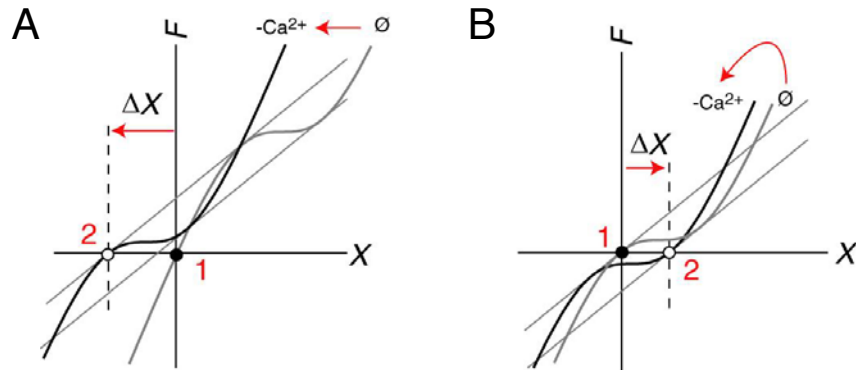


Figure IV-17 : Interprétation géométrique des mouvements ciliaires en réponse à une diminution transitoire de $[Ca^{2+}]$, pour une touffe ciliaire non soumise à une force extérieure. Courbe F/X grise : caractéristique F/X de la cellule au repos ; courbe F/X noire : caractéristique F/X lorsqu'un chélateur du calcium est éjecté (la courbe a glissé dans la direction négative, selon la droite de pente K_{SP}) ; droites grises : corridor constitué des droites de pentes K_{SP} tangentes à la courbe F/X . **A.** Lorsque le point de fonctionnement (1) de la cellule est porté par une région de la courbe F/X plus pentue que K_{SP} , la touffe ciliaire répond en se déplaçant dans la direction négative. **B.** Lorsque le point de fonctionnement (1) de la cellule est porté par une région de la courbe F/X moins pentue que K_{SP} , la touffe ciliaire répond en se déplaçant dans la direction positive.

Les cellules que nous choisissons pour cette étude n'oscillaient pas, ce qui suggère que leur raideur est en tout point positive, mais les polarités des mouvements observés impliquent, dans le cadre de notre modèle, qu'il existe une zone de raideur inférieure à K_{SP} dans la courbe F/X . Les biais appliqués à la position de la touffe ciliaire viennent modifier la probabilité d'ouverture au repos. Le point de fonctionnement correspondant peut passer sous l'effet de ces offsets d'une région de forte pente à une région de faible pente. C'est pourquoi l'on observe des mouvements qui changent de polarité avec l'offset pour un même ion éjecté.

Les changements de polarité observés sur les figures III-24 et III-25.A suggèrent que les points de fonctionnement résident dans la partie à forte pente à gauche de la zone non linéaire des courbes F/X . Les offsets croissants viennent progressivement ramener le point de fonctionnement au sein de la zone plate ce qui cause le retournement de polarité, que ce soit en augmentant ou en diminuant le

calcium. L'inversion de la polarité des mouvements dans le sens négatif→positif quand on éjecte un chélateur du calcium (Figure III-24) et positif→négatif quand on éjecte du calcium (Figure III-25.A) est donc expliquée par l'entrée du point de fonctionnement dans la zone non linéaire de raideur faible de la caractéristique F/X lorsque l'on augmente le biais appliqué à la touffe ciliaire.

Nous avons également observé une cellule qui répond à une éjection de calcium par un mouvement ciliaire dont la polarité changeait dans le sens négatif→positif en augmentant le biais (Figure III-25.C). Ce changement de polarité, observé pour des grands offsets, correspond à un point de fonctionnement qui quitte la zone non linéaire lorsque l'on augmente le biais. Ceci implique que pour tous les déplacements de polarité négative observés sur cette cellule, les offsets correspondant maintenaient la touffe ciliaire dans une zone plate de sa caractéristique F/X . On peut estimer une borne inférieure de la taille de cette zone à partir de la mesure de l'offset nécessaire pour obtenir le changement de polarité. Si l'on suppose que le taux d'adaptation est de 80%, on en déduit une largeur de ~ 350 nm au moins, ce qui est bien supérieur aux observations expérimentales, qui lui attribue une valeur aux alentours d'une centaine de nm [Howard & Hudspeth, 1988 ; Ricci *et al*, 2002]. Il est possible que le processus venant limiter l'étendue de l'adaptation (le ressort K_{ES} dans notre modèle) de cette cellule ait été endommagé, et que l'on ait ici un taux d'adaptation supérieur à 80%.

Les simulations numériques utilisant un échelon de S pour mimer une variation transitoire de $[Ca^{2+}]$ confirment cette interprétation géométrique. La dynamique simulée reproduit qualitativement celle observée expérimentalement (Figure IV-18).

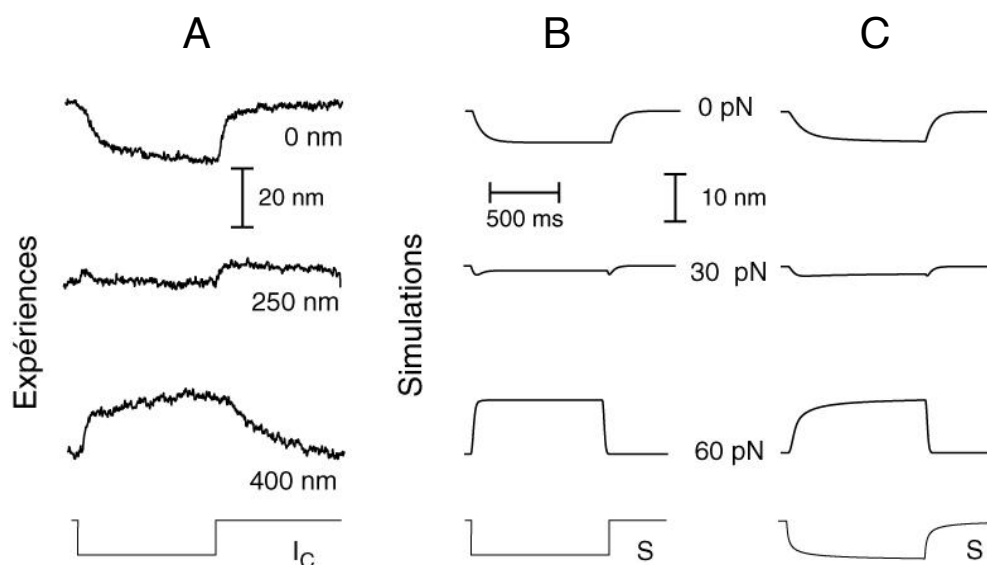


Figure IV-18 : Simulations numériques de la dynamique observée en réponse à une réduction de $[Ca^{2+}]$. **A.** Observations expérimentales (Figure III-24.A) : réponse à une éjection d'ATP, en faisant varier le biais appliqué à la cellule. **B.** Simulations numériques, paramètres donnés dans l'annexe G, colonne L. Réponse à un échelon de S (S passe de 1 à 0,5) lorsque la force statique appliquée varie. **C.** Simulations numériques avec les mêmes paramètres, mais en prenant pour S un profil de diffusion à partir d'un point source situé à $4\ \mu m$ du système dynamique, avec le coefficient de diffusion du calcium dans l'eau.

Une limitation de cette interprétation concerne les mouvements biphasiques de faible amplitude qui sont observés à proximité de l'offset qui induit le changement de polarité. Lorsque la trajectoire dans le diagramme F/X en réponse à un échelon de S passe d'une zone pentue de la courbe F/X à la zone plate (comme c'est le cas sur la trace observée pour $F_{ext} = 30\ pN$ de la figure IV-18), la dynamique de la touffe ciliaire est biphasique. Les simulations numériques utilisées pour reproduire le changement de polarité négatif→positif en chélatant le calcium indiquent que les dynamiques biphasiques sont composées d'un mouvement d'abord négatif puis positif, lorsque la force extérieure est proche de celle nécessaire pour obtenir le changement de polarité. Or c'est l'inverse que l'on observe expérimentalement (Figure IV-18). Lorsqu'elle se produit, cette excursion positive anormale est d'amplitude faible (inférieure à 5 nm sur toutes les mesures), mais a été observée sur 5 cellules différentes. Notre modèle simple néglige toute dépendance en calcium de la forme de la caractéristique F/X . Il est possible que cette courbe se déforme lorsque l'on fait varier brutalement $[Ca^{2+}]$ par iontophorèse (Figure III-20), et que les effets de cette déformation se manifestent lorsque les effets du glissement de cette courbe deviennent petits, c'est-à-dire à proximité du changement de polarité, et soient masqués par ce glissement autrement.

Une conclusion importante de l'interprétation des mouvements de la touffe ciliaire induits par le calcium est qu'il est nécessaire que la touffe ciliaire possède au sein de son complexe de transduction un élément qui vient limiter l'extension de l'adaptation (pris en compte dans notre modèle par le ressort d'extension K_{ES}). Les changements de polarité observés lors de ces expériences constituent un indice indirect de l'existence d'un tel élément.

B.4. Effets du calcium sur la cinétique des mouvements actifs

B.4.1. Modification des caractéristiques du twitch par le calcium

Nous avons observé expérimentalement que les caractéristiques cinétiques du twitch positif variaient avec la concentration extracellulaire de calcium (voir le paragraphe III.B.1). Pour une même stimulation et en augmentant le calcium, on observe que le twitch est de plus en plus rapide, et que son amplitude diminue lentement (Figure III-6). Nous avons tenté de reproduire numériquement ces résultats, en simulant une augmentation de $[Ca^{2+}]$ par des valeurs croissantes du paramètre S . La cellule de la figure III-6 était oscillante en endolymphe et rendue quiescente par un courant de iontophorèse faible, nous sommes donc partis d'une valeur de S faible. La gamme de calcium testée varie de $\sim 400 \mu M$ à $\sim 7 mM$, ce que nous avons traduit par une variation de S sur environ un ordre de grandeur.

La dynamique simulée (Figure IV-19.A) reproduit avec un bon accord le mouvement de la touffe ciliaire mesuré expérimentalement (Figure III-6.A). Les caractéristiques du twitch obtenu numériquement ont une dépendance en le paramètre S qui mime celle du twitch observé expérimentalement. Les grandeurs temporelles du twitch varient beaucoup plus vite que son amplitude. Les simulations numériques permettent de plus d'interpréter la diminution de son amplitude. Lorsque S augmente, la probabilité d'ouverture au repos devient de plus en plus faible et un échelon de force de 25 pN ne parvient plus à ouvrir la totalité des canaux (45% au maximum pour la valeur $S = 8,6$).

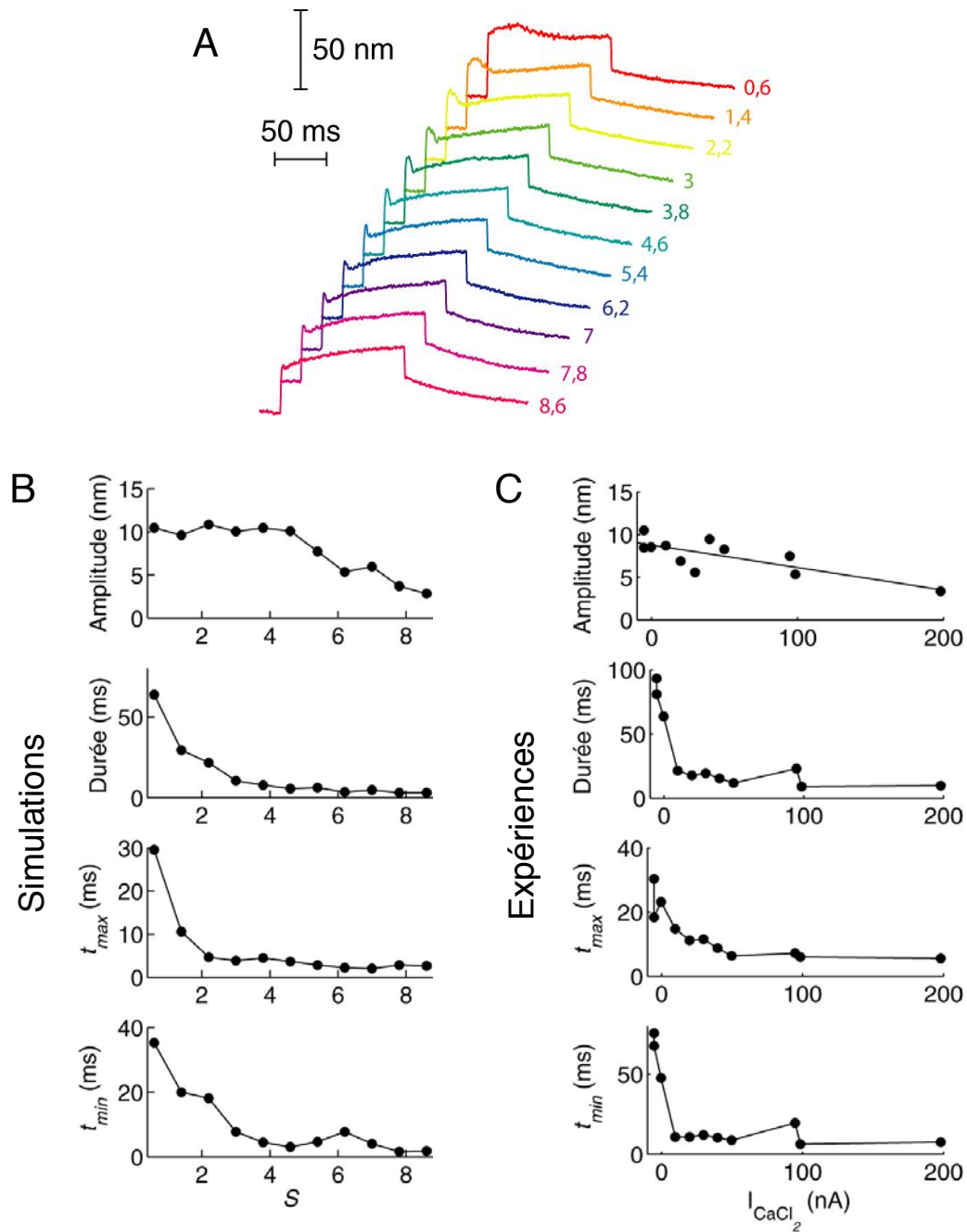


Figure IV-19 : Simulations numériques de la dépendance en calcium des caractéristiques du twitch. Les paramètres utilisés sont donnés dans l'annexe G, colonne G, le stimulus est un échelon de force de 25 pN. **A.** Mouvements de la touffe ciliaire simulés, moyennés 10 fois. **B.** Amplitude et caractéristiques temporelles mesurées sur ces simulations, en fonction de S . **C.** Caractéristiques du twitch, mesurées expérimentalement (repris de la figure III-6).

B.4.2. Effets du calcium sur les caractéristiques temporelles des oscillations spontanées

Dans le paragraphe III.B.2 sont décrites des expériences où l'on vient perturber une cellule oscillante en augmentant la concentration de calcium à proximité de sa touffe ciliaire. Nous avons vu que l'effet majeur de cette augmentation portait sur les caractéristiques temporelles des oscillations (Figure III-9) : alors que la durée de la composante lente négative reste pratiquement inchangée, celle de la phase lente positive est quasiment divisée par 10 pour les courants iontophorétiques saturants.

Pour simuler les effets d'une variation de $[Ca^{2+}]$ sur une touffe ciliaire, nous nous sommes donné un ensemble de paramètres qui génèrent une courbe F/X possédant une zone de raideur négative à l'intérieur de laquelle on trouve le point de fonctionnement. Les différentes valeurs de $[Ca^{2+}]$ sont simulées en faisant varier le paramètre S (voir le paragraphe II.D) dans une gamme où des oscillations sont observables. Pour chaque valeur de S , des cycles d'oscillations sont générés numériquement en tenant compte du bruit pendant environ 10 s. Le même algorithme de mesure de la forme des oscillations utilisé sur les traces expérimentales leur est ensuite appliqué (paragraphe II.C.4), et donne les mesures présentées ci-dessous (Figure IV-20.A et B).

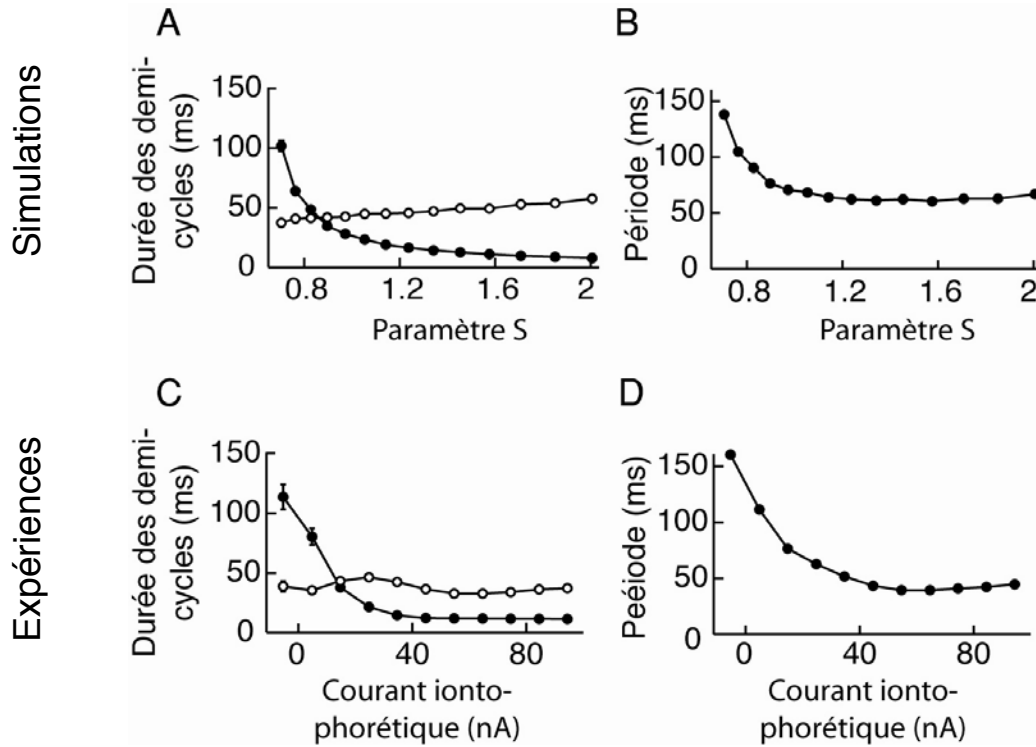


Figure IV-20 : Dépendance des grandeurs temporelles des oscillations avec le calcium. Comparaison entre les simulations numériques et les mesures expérimentales. **A.** et **B.** Simulations numériques avec les paramètres donnés dans la colonne B du tableau de l'annexe G. **C.** et **D.** Mesures expérimentales (voir III.B.2.1). Gauche : durée des demi-cycles positifs t_+ (●) et négatifs t_- (○). Droite : périodes. Valeur moyenne \pm erreur standard.

On remarque qu'il existe un bon accord qualitatif entre les expériences et les simulations. La variation des grandeurs temporelles caractéristiques des oscillations spontanées est bien décrite par notre modèle. Celui-ci impute la diminution de t_+ , la durée moyenne des demi-cycles positifs, à une vitesse des moteurs croissante avec S lors de cette phase (Figure IV-21) : pour $S = 0,5$, la vitesse moyenne $\langle \dot{X}_a \rangle$ est de $\sim 0,6 \mu\text{m/s}$ lors de la phase lente positive et négative. Lorsque $S = 1$, celle-ci est de $\sim 1 \mu\text{m/s}$ pour la phase lente positive et $\sim 0,7 \mu\text{m/s}$ pour la phase lente négative. Cette augmentation de vitesse pour la partie positive du cycle est due à une force d'arrêt F_a qui devient de plus en plus faible lorsque S croît. Comme $F_a = F_{\max} (1 - SP_o)$, les variations de S n'ont d'impact sur les oscillations que lorsque que $P_o \neq 0$, soit pour la phase lente positive. La durée de la phase lente positive est donc réduite lorsque S croît, et entraîne les variations de périodes et de rapports cycliques observés.

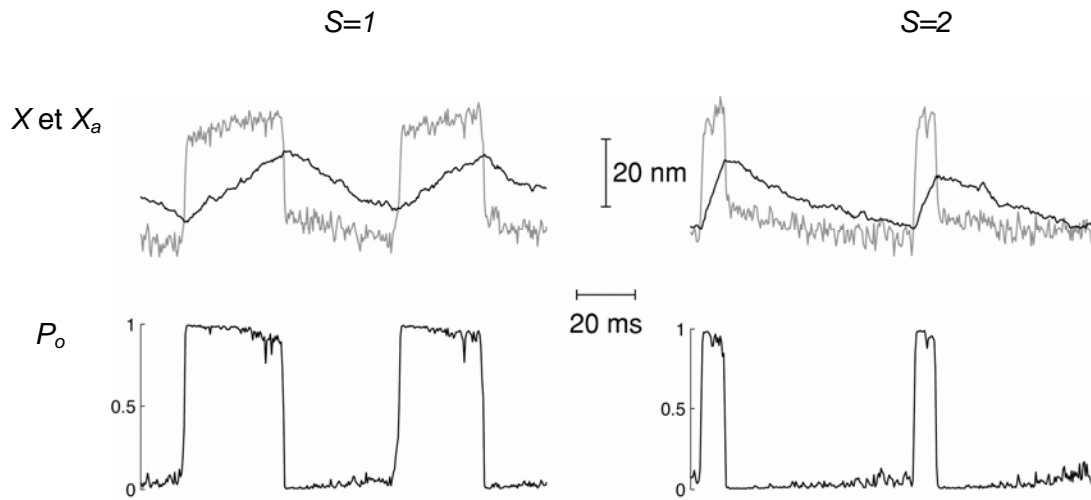


Figure IV-21 : Aspect des oscillations spontanées simulées numériquement, pour deux valeurs de S . Haut : X (gris) et X_a (noir). Lorsque S est doublé, la vitesse du moteur lors de la phase lente positive augmente grandement, alors qu'elle est quasiment inchangée lors de la phase lente négative, ce qui modifie par conséquent le rapport cyclique. Bas : probabilité d'ouverture en fonction du temps (Données de la figure IV-20.A et B).

C. Génération de force par les touffes ciliaires des mammifères

Des mesures récentes sur des cellules ciliées externes de la cochlée du rat [Kennedy *et al*, 2005] démontrent l'existence de courbes force/déplacement non-linéaires qui développent une région de pente négative au cours du temps, lorsque la mesure est effectuée quelques millisecondes après la stimulation (Figure IV-22). De plus, la réponse de certaines cellules montre que l'excursion de la touffe ciliaire peut dépasser en amplitude le mouvement de la base de la fibre qui lui a donné naissance. Les touffes ciliaires du rat semblent capables de générer des forces importantes, de quelques centaines de pN. Nous avons cherché à savoir si notre modèle de la mécanique ciliaire permet l'interprétation de ces résultats.

C.1. Courbes force/déplacement effectives

Les courbes force/déplacement sont mesurées en stimulant une touffe ciliaire par une fibre souple, dont on déplace la base par un créneau (Figure IV-22). La connaissance de la raideur de la fibre et de la position de sa base permet de calculer la force appliquée à la touffe ciliaire, en mesurant le déplacement de celle-ci. À un instant t , chaque marche de stimulation, que l'on indexera par i , entraîne un déplacement $X_i(t)$ de la touffe ciliaire, dont la mesure permet l'obtention d'un

couple $(X_i, F_i)(t)$. L'ensemble des points (X_i, F_i) à un instant t donne une courbe force/déplacement des figures sus-citées. Cette courbe est tracée pour des instants successifs, et l'on peut voir qu'elle évolue pour présenter une pente négative (Figure IV-22.A). À partir de ces courbes force/déplacement, les auteurs concluent que la non-linéarité s'accroît au fur et à mesure que l'adaptation se produit. En ajustant ces courbes par l'équation I.6, on trouve un produit NZ qui croît avec le temps.

Les courbes force/déplacement ne peuvent être reliées simplement aux caractéristiques du complexe de transduction que si elles sont mesurées dans un délai court devant le temps caractéristique de l'adaptation. Si ce n'est pas le cas, elles sont difficiles à interpréter (voir la section II.C.2.3). Sur la figure IV-22, on observe que ces courbes force/déplacement effectives exhibent une pente négative pour des délais de l'ordre de 8 ms, ce qui est plus long que l'échelle de temps caractéristique de l'adaptation chez le rat [Kennedy *et al*, 2003]. On ne peut donc pas utiliser les ajustements de ces courbes par l'équation I.6 pour mesurer la force de transduction dans les touffes ciliaires des cellules ciliées externes du rat. On ne peut le faire qu'avec la courbe mesurée juste après stimulation.

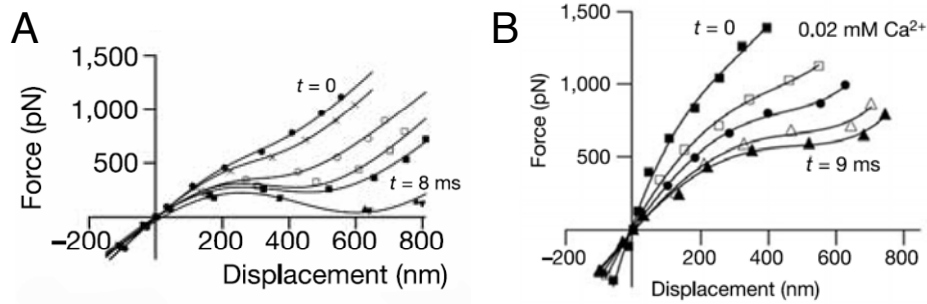


Figure IV-22 : Courbes force/déplacement tirées de [Kennedy *et al*, 2005], pour deux concentrations de calcium extracellulaire différentes (**A.** : 1,5 M, **B.** : 0,2 M).

On peut toutefois relier ces courbes et leur évolution temporelle aux caractéristiques mécaniques de la touffe ciliaire. Soit $X_i(t)$ la réponse d'une touffe ciliaire à une force F_i , appliquée par la déflexion d'une fibre de raideur K_F à $t = 0$. À quelle condition observe-t-on des courbes $F_i = f(X_i)$ qui possèdent une pente locale négative lorsque le processus d'adaptation a fini d'opérer ? Chaque F_i est tel que $F_i = K_F (\Delta_i - X_i)$, où Δ_i est le déplacement de la base de la fibre. On cherche une condition pour laquelle

$$\frac{dF_i}{dX_i} = K_F \left(\frac{d\Delta_i}{dX_i} - 1 \right) < 0$$

Or l'équilibre des forces impose $F_i = K_{GS} (\bar{X}_i - \bar{X}_{ai} - DP_{oi}) + K_{SP} \bar{X}_i$

où K_{SP} est la raideur des pivots de la touffe ciliaire. F_i , P_{oi} , \bar{X}_i et \bar{X}_{ai} sont des fonctions du temps. Dans la toute la suite, on utilisera les équations réduites I.13-I.15. La condition recherchée s'écrit, dans l'état stationnaire ($t \rightarrow \infty$) :

$$\left. \frac{dF_i}{d\bar{X}_i} \right|_{stat} = K_{GS} \left(1 - \frac{d\bar{X}_{ai}}{d\bar{X}_i} \right) \left(1 - \frac{D}{\delta} P_{oi} (1 - P_{oi}) \right) + K_{SP} < 0$$

$d\bar{X}_{ai}/d\bar{X}_i$ est donné dans l'état stationnaire par l'équation IV.8 :

$$\left. \frac{d\bar{X}_{ai}}{d\bar{X}_i} \right|_{stat} = \frac{1}{1 + K_{ES}/\bar{K}_{GSi}}$$

avec

$$\bar{K}_{GSi} = K_{GS} \left(1 - \frac{D}{\delta} \left(1 - \frac{S F_{\max}}{K_{GS} D} \right) P_{oi} (1 - P_{oi}) \right)$$

d'où

$$\left. \frac{dF_i}{d\bar{X}_i} \right|_{stat} = \frac{1}{1 + \bar{K}_{GSi}/K_{ES}} K_{GS} \left(1 - \frac{D}{\delta} P_{oi} (1 - P_{oi}) \right) + K_{SP} \quad (IV.14)$$

Remarquons que si $K_{ES} = 0$, on trouve $dF_i/d\bar{X}_i = K_{SP}$. Si l'adaptation est complète, la raideur effective que l'on obtient lorsque la cellule a adapté est simplement la raideur des pivots. La forme complexe des courbes obtenues dans la cochlée du rat est une indication indirecte que l'adaptation est incomplète pour les cellules ciliées de cet organe.

Pour les déplacements saturants tels que $P_{oi} = 0$ ou 1 dans l'état stationnaire, $\bar{K}_{GSi} = K_{GS}$ et

$$\left. \frac{dF_i}{d\bar{X}_i} \right|_{stat, P_{oi}=0,1} = \frac{K_{GS} K_{ES}}{K_{ES} + K_{GS}} + K_{SP}$$

ce qui permettrait d'obtenir une estimation de K_{ES} en analysant les courbes. Mais sur la figure IV-22, la gamme des déplacements sondés ne permet pas d'avoir une bonne précision sur les branches linéaires où $P_{oi} = 0$ ou 1 de ces courbes.

Pour traduire la condition d'obtention d'une raideur effective négative, on étudie la pente locale pour les déplacements tels que $P_{oi} = 0,5$. Dans ce cas

$$\bar{K}_{GSi} = K_{GS} \left(1 - \frac{D}{4\delta} \left(1 - \frac{S F_{\max}}{K_{GS} D} \right) \right)$$

La condition s'écrit alors

$$\left. \frac{dF_i}{d\bar{X}_i} \right|_{stat, P_{oi}=1/2} = \frac{1}{1 + \bar{K}_{GSi}/K_{ES}} K_{GS} \left(1 - \frac{D}{4\delta} \right) + K_{SP} < 0$$

soit

$$K'_{GS} \left(\frac{D}{4\delta} - 1 \right) > K_{SP} \quad (IV.15)$$

avec $K'_{GS} = K_{GS} \frac{1}{1 + \bar{K}_{GSi}/K_{ES}}$.

Cette condition est à rapprocher de la condition de raideur négative exposée dans la partie I.E.2.3, et qui s'écrit $K_{GS} \left(\frac{D}{4\delta} - 1 \right) > K_{SP}$. Comme le signe de \bar{K}_{GSi} dépend de manière complexe des paramètres de la cellule, on ne peut affirmer qu'une condition est toujours plus forte qu'une autre.

- Considérons un premier cas où $\bar{K}_{GSi} < 0$. Pour que cette situation soit réalisée, il est nécessaire que $SF_{\max} < K_{GS}D$, ce qui est favorisé pour de faibles concentrations de calcium extracellulaire, et $D > 4\delta$. Si $|\bar{K}_{GSi}| < K_{ES}$, alors $K'_{GS} > K_{GS}$, et il est possible d'observer une raideur effective négative (condition IV.15), alors que la condition de raideur négative (équation I.8) n'est pas réalisée. Supposons maintenant que $|\bar{K}_{GSi}| > K_{ES}$. K'_{GS} est alors négatif et $K'_{GS} \times (D/4\delta - 1)$ est négatif. La condition IV.15 n'est pas réalisable. Remarquons qu'à faible calcium chez le rat, la courbe F/X négative n'adopte pas de pente négative à l'état stationnaire (Figure IV-22.B).
- Les situations où $\bar{K}_{GSi} > 0$ sont rencontrées lorsque $SF_{\max} > K_{GS}D$, soit lorsque la concentration en calcium extracellulaire est importante. On a alors $0 < K'_{GS} < K_{GS}$, et l'existence d'une zone de raideur négative dans la caractéristique F/X est nécessaire à l'observation d'une raideur effective négative. La mesure d'une région de raideur négative nécessite de travailler à déplacement imposé [Martin *et al*, 2000], ce qui n'est pas le cas lors de ces expériences : il est possible qu'une telle propriété soit présente ici sans qu'on parvienne à la mesurer.

Notre modèle parvient à reproduire les formes et l'évolution des courbes force/déplacement effectives publiées chez le rat (Figure IV-23). On peut utiliser les calculs présentés plus haut pour essayer d'obtenir des paramètres permettant l'ajustement au plus près de ces courbes.

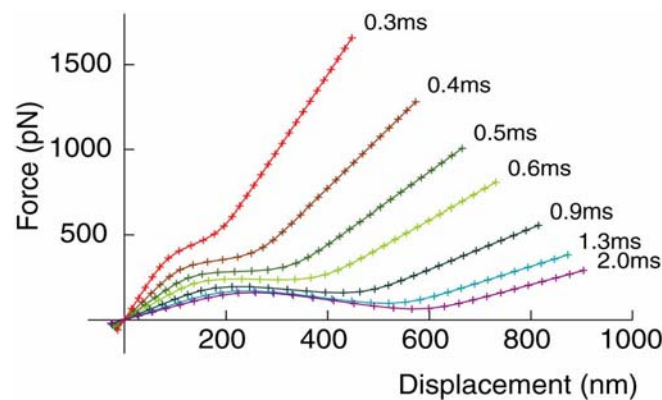


Figure IV-23 : Courbes force/déplacement effectives simulées, mesurées pour les délais après stimulation indiqués en légende. Les paramètres utilisés sont donnés dans l'annexe G, colonne M, raideur de la fibre utilisée : $K_F = 3 \text{ pN/nm}$.

La non-linéarité observée sur la courbe F/X effective mesurée au bout d'un temps long est très large. Ceci peut se comprendre grâce à l'équation IV.14 : la pente localement négative de cette courbe est obtenue pour des valeurs où P_{oi} la probabilité d'ouverture dans l'état stationnaire vaut $\sim 0,5$. Comme cette probabilité d'ouverture ne dépend que de la différence $X_i - X_{ai}$ dans l'état stationnaire, la gamme des déplacements X_i pour lesquels P_{oi} n'est pas saturée à 0 ou 1 peut être grande, et ce d'autant plus que K_{ES} est faible. En effet, si à l'état stationnaire $X_{ai} = \alpha X_i$, où α est le taux d'adaptation, la courbe sigmoïdale $P_o(X_i - X_{ai}) = P_o((1-\alpha) X_i)$ tracée en fonction de X_i aura une largeur $\sim 1/(1-\alpha)$ fois celle de la courbe d'activation intrinsèque. De plus nous avons montré que ce facteur α caractérisant la complétude de l'adaptation peut devenir important et varie de manière complexe avec K_{ES} , S et F_{\max} (voir le paragraphe A.2.7). Si l'on se donne un taux d'adaptation de $\alpha=80\%$ et si la gamme de sensibilité est de 100 nm, on peut trouver dans l'état stationnaire une gamme de déplacements X_i pour lesquels P_{oi} n'est pas saturée s'étendant sur ~ 500 nm.

C.2. Mouvement actif de la touffe ciliaire

Dans le même article sont reportées des mesures où la touffe ciliaire exerce du travail mécanique sur la fibre qui la met en mouvement. Partant d'un état stable, la touffe ciliaire est défléchie par un mouvement de la base de la fibre Δ . En réponse à cette stimulation, le déplacement de la touffe ciliaire observé excède dans l'état stationnaire le déplacement de la base de la fibre (Figure IV-24.A). En conséquence, la fibre exerce dans cet état une force contre la touffe ciliaire. Il est possible d'exprimer les conditions permettant l'observation de ce comportement à l'aide d'un raisonnement géométrique.

La force qu'exerce la fibre s'écrit comme précédemment $F_i = K_F (\bar{\Delta}_i - \bar{X}_i(t))$. On cherche une condition suffisante permettant d'avoir $F_i < 0$ dans l'état stationnaire avec $\bar{X}_i > 0$, soit $\bar{\Delta}_i < \bar{X}_i$. Comme précédemment :

$$F_i = K_{GS}(\bar{X}_i - \bar{X}_{ai} - DP_{oi}) + K_{SP} \bar{X}_i = K_F(\bar{\Delta}_i - \bar{X}_i)$$

soit

$$K_{GS}(\bar{X}_i - \bar{X}_{ai} - DP_{oi}) + (K_{SP} + K_F) \bar{X}_i = K_F \bar{\Delta}_i \quad (IV.16)$$

Le membre de gauche de cette équation représente l'équation de la courbe force/déplacement d'une cellule possédant une raideur de pivot égale à $K'_{SP} = K_{SP} + K_F$. La position de la touffe ciliaire dans l'état stationnaire sera donnée par l'intersection de la courbe d'équation $F_i^{eff} = K_{GS}(\bar{X}_i - \bar{X}_{ai} - DP_{oi}) + K'_{SP} \bar{X}_i$ et la droite horizontale $K_F \bar{\Delta}_i$. Comme on cherche de plus $\bar{\Delta}_i < \bar{X}_i$, tous les points (\bar{X}_i, F_i^{eff}) portés par la courbe $F_i^{eff} = f(\bar{X}_i)$ et situés sous la droite de pente K_F conviendront. \bar{X}_i , \bar{X}_{ai} et P_{oi} désignent dans l'équation IV.16 les grandeurs atteintes dans l'état stationnaire en présence du stimulus d'amplitude Δ_i . La courbe

$F_i^{eff} = f(\bar{X}_i)$ désigne donc une courbe force/déplacement effective atteinte dans cet état stationnaire. Une illustration schématique de cette condition est présentée figure IV-24.C. Le point de la courbe F/X rouge atteint dans l'état stationnaire en présence du stimulus correspondra à un déplacement qui excède celui de la base de la fibre à condition qu'il se trouve sous la droite de pente K_F .

La figure IV-24.B montre une simulation numérique résultant de cette analyse et présentant un mouvement de la touffe ciliaire plus grand que celui de la base de la fibre. La gamme de déplacement pour laquelle ce phénomène est observé est limitée par la largeur de la région non-linéaire dans la courbe $F_i^{eff} = f(X_i)$; un ordre de grandeur de cette taille est donnée par 4δ . Comme remarqué précédemment, les mesures chez le rat indiquent que δ est de l'ordre de 100 nm, ce qu'il est difficile d'obtenir avec une modélisation du canal à deux états. La cinétique de la probabilité d'ouverture reflète les choix des constantes λ et λ_a . Les paramètres sont tels que l'on devrait observer un twitch mécanique si les échelles de temps étaient très séparées (voir le paragraphe A.2.4), or les expériences ne montrent pas de tels comportements. Nous avons donc utilisé des valeurs proches pour λ et λ_a , ce qui rend la cinétique d'adaptation limitée par ces valeurs, et ne permet pas d'observer deux cinétiques lente et rapide.

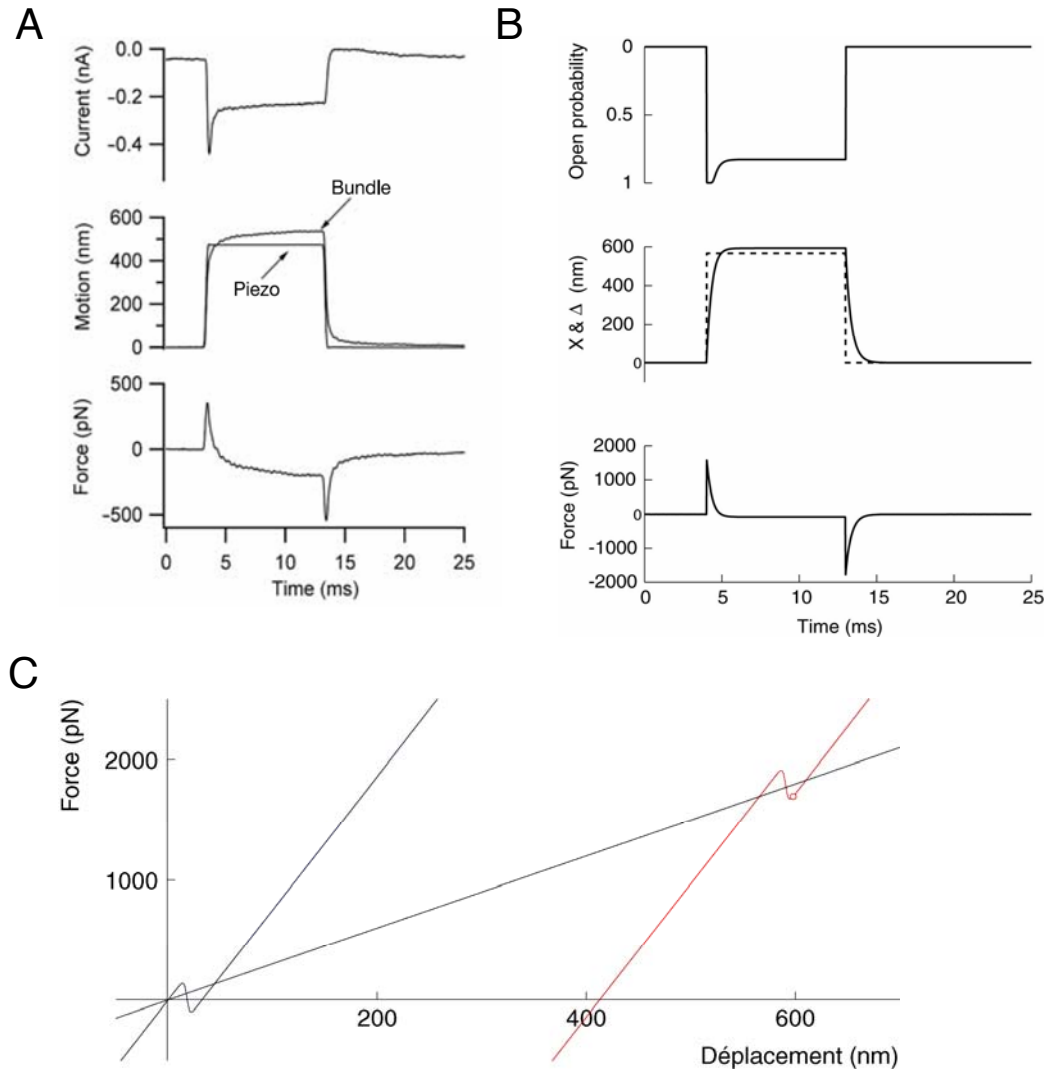


Figure IV-24 : **A.** Génération de force par la touffe ciliaire de la cochlée du rat. La touffe ciliaire se déplace d'une quantité supérieure à l'amplitude du stimulus qui a généré son mouvement. Tiré de [Kennedy et al, 2005]. **B.** Simulation numérique montrant le même phénomène, en utilisant les paramètres de l'annexe G, colonne N, avec une fibre de 3 pN/nm. **C.** Courbes F/X effectives associées à la simulation de la figure B. Bleu : courbe sans stimulus, rouge : courbe dans l'état stationnaire en présence d'une force de 1700 pN, noir : droite $F = K_F X$. Le point rouge dénote l'état stationnaire en présence du stimulus.

V. CONCLUSION

Contrôle de la dynamique ciliaire

L'étude présentée dans ce manuscrit a permis de préciser les conditions d'obtention de 3 classes de mouvements ciliaires actifs observables sur les cellules ciliées de la grenouille taureau. L'observation de l'un de ces mouvements actifs est reliée à l'existence d'une zone de pente inférieure à K_{SP} dans la caractéristique F/X et à la position du point de fonctionnement par rapport à cette zone.

On dispose de deux paramètres extérieurs pour modifier le point de fonctionnement au repos de la cellule :

- Le calcium. L'effet majeur d'une modification de $[Ca^{2+}]$ est de faire glisser la caractéristique F/X . Ce glissement est tel qu'il peut changer le comportement dynamique d'une cellule. Ainsi, dans le paragraphe III.C.1 sont décrits les passages d'un comportement à l'autre, induits par le calcium, pour toutes les situations de départ et d'arrivée possibles.
- Biais statique. Parce que l'adaptation est incomplète, des biais statiques imposés à une touffe ciliaire modifient la probabilité d'ouverture au repos,

et par là, le point de fonctionnement de la cellule. Comme décrits dans le paragraphe III.C.2, ces biais peuvent être utilisés pour induire des oscillations sur une cellule initialement quiescente.

On a donc avec les cellules ciliées du saccule de la grenouille taureau un modèle d'étude des mouvements ciliaires actifs extrêmement bien contrôlé. Deux paramètres différents ($[Ca^{2+}]$ et le biais statique) peuvent être ajustés expérimentalement pour modifier à souhait la dynamique d'une touffe ciliaire. Ce contrôle va jusqu'à permettre l'ajustement de la cinétique des mouvements actifs. Nous avons montré que l'on pouvait modifier dans une certaine gamme la fréquence des oscillations spontanées et les caractéristiques temporelles du twitch positif avec le calcium. Le saccule de la grenouille taureau est un modèle expérimental qui ne possède pas d'arrangement tonotopique des cellules ciliées, comme c'est le cas pour la cochlée, mais offre un niveau de contrôle de la dynamique ciliaire encore inégalé.

Un modèle simple pour la dynamique ciliaire

La dynamique de ces mouvements actifs est bien décrite par le modèle utilisé lors de ce travail, dont la vertu principale est d'être simple et concis. Il néglige la dépendance en calcium des paramètres mécaniques statiques de la touffe ciliaire, ce qui est faux en toute rigueur, comme le montre certaines de nos expériences. Néanmoins, il est suffisant pour décrire et interpréter au moins qualitativement les phénomènes observés sur les touffes ciliaires provenant de la grenouille, de la tortue et du rat. D'autre part, les paramètres qu'il utilise sont, au moins chez la grenouille, bien connus grâce aux mesures des courbes F/X , ce qui permet facilement de faire le lien entre expériences et prédictions du modèle.

Ce modèle n'inclut pas de mécanisme décrivant la refermeture du canal promue directement par l'entrée de calcium, comme ceux décrits dans le paragraphe I.D.6, mais parvient toutefois à interpréter certains des phénomènes attribués à l'adaptation rapide. Les questions de savoir dans quelle mesure un tel mécanisme affecte les dynamiques observées et quels éléments du complexe de transduction le sous-tendent sont laissées entières par ce travail de thèse.

Notre modèle simple ne parvient pas à expliquer toutes les observations faites de manière quantitative totalement satisfaisante. Il prend mal en compte la réponse d'une touffe ciliaire à de très grandes déflexions. Il ne parvient pas à expliquer les petits mouvements biphasiques en réponse à un échelon de $[Ca^{2+}]$ en présence d'un biais statique (voir le paragraphe IV.B.3.3). L'amplitude des mouvements actifs qu'il produit est limitée par la largeur de la zone non linéaire de pente inférieure à K_{sp} . Mais ce modèle est un modèle minimal :

- il ne peut contenir moins d'élément. Un modèle qui inclura un des mécanismes proposés pour décrire l'adaptation rapide sera bâti sur ce modèle. Les phénomènes que le modèle simple parvient à décrire seront également présent dans le modèle augmenté ;

- les phénomènes qu’il ne parvient pas expliquer donnent une indication sur les mécanismes qu’il faudra inclure pour le compléter.

Les mesures précises décrites dans le paragraphe III.D.2 indiquent que la raideur du ressort de transduction k_{GS} croît et que l’amplitude du changement conformationnel d diminue lorsque le calcium extracellulaire voit sa concentration extracellulaire augmenter. On peut imaginer qu’une dépendance de ces deux paramètres en la concentration intracellulaire de calcium instantanée C (qui varie lorsque la touffe ciliaire est soumise à une déflexion qui ouvre ou ferme les canaux de transduction) pourrait générer un mécanisme d’adaptation dite rapide. Nos données sont toutefois trop peu nombreuses pour pousser l’analyse plus loin.

Le ressort d’extension K_{ES}

Plusieurs observations expérimentales indiquent qu’il existe au sein de la touffe ciliaire un élément qui vient limiter le phénomène d’adaptation. La mesure des courants de transduction en réponse à des déflexions statiques [Shepherd & Corey, 1994] montrent que les courbes P_o/X se déplacent dans l’état stationnaire en une abscisse X_a valant $\sim 80\%$ de l’amplitude de la déflexion statique X appliquée. En conséquence, on observe un courant résiduel différent de celui mesuré au repos. Des offsets statiques parviennent à modifier la probabilité d’ouverture dans l’état stationnaire, et changent donc le point de fonctionnement de la cellule. Deux séries d’expériences rapportées dans ce manuscrit illustrent ces changements de point de fonctionnement. Nous avons montré dans le paragraphe III.C.2 qu’il était possible d’induire des oscillations sur une touffe ciliaire initialement quiescente en lui appliquant un biais statique. Il est probable que ces oscillations induites soient observées parce que le biais statique parvient à placer le point de fonctionnement au sein de la zone instable de la caractéristique F/X de la touffe ciliaire. D’autre part, au paragraphe III.E sont décrits des expériences où la réponse de la touffe ciliaire à un changement transitoire de $[Ca^{2+}]$ dépend en amplitude, polarité et cinétique du biais statique appliqué à la position X , ce qui traduit également un changement de point fonctionnement.

L’incomplétude de l’adaptation est décrite par notre modèle au travers d’un élément élastique de raideur K_{ES} qui vient limiter le déplacement X_a . Cet élément limite la gamme de déflexions transitoires pour lesquelles on observe les phénomènes de twitches (paragraphe IV.A.2.5), et explique le changement de comportement dynamique induit par un biais statique (paragraphe IV.B.3.2). Pour reproduire dans nos simulations numériques un mouvement X_a qui vaut 80% de la déflexion X dans l’état stationnaire, il a fallu choisir une valeur de K_{ES} valant environ K_{GS} (voir le paragraphe IV.A.2.5), supérieure aux estimations précédentes [Shepherd & Corey, 1994] faites en négligeant la non-linéarité de la relation F/X et la dépendance en calcium de la force d’arrêt du moteur de l’adaptation. De manière

cohérente, avec une telle valeur, notre modèle prédit une gamme de déflexion pour laquelle on observe du twitch compatible avec celle observée expérimentalement.

L'amplificateur ciliaire

Rana catesbeiana appartient au groupe phylogénétique des lissamphibiens, distinct de celui des amniotes qui inclut les oiseaux, les lézards, les tortues et les mammifères, et qui est d'intérêt supérieur pour les applications médicales. Les homologues que l'on peut faire entre les organes auditifs de ces deux groupes sont soumises à discussion [Lombard, 1980 ; Manley & Köppl, 1998]. Toutefois, les études phylogénétiques [Manley, 2000 ; Manley & Köppl, 1998] indiquent que l'amplificateur ciliaire est un caractère ancien. Tous les vertébrés terrestres étudiés jusqu'ici possèdent des émissions otoacoustiques spontanées de formes très similaires, ce qui pourrait être la conséquence d'un mécanisme d'amplification, localisé dans la touffe ciliaire des cellules ciliées. Ce mécanisme pourrait être apparu avant que les vertébrés ne se diversifient, dans le système vestibulaire de leur ancêtre commun. Les auteurs soulignent que les changements principaux apparus après cette diversification concernent (pour ce qui est de l'audition) l'oreille médiane et la spécialisation des cellules ciliées chez certaines espèces, mais pas les mécanismes fondamentaux de leur activité¹.

En conséquence de quoi, d'une part les résultats concernant l'amplificateur ciliaire déduits des observations chez la grenouille taureau devraient être généralisables à tous les vertébrés, d'autre part, le fait que ces résultats soient issus d'observations sur un organe du vestibule n'entache pas leur pertinence vis à vis d'organes auditifs. Le fait que notre modèle simple, mis au point initialement pour décrire les oscillations spontanées observées dans le saccule de la grenouille taureau, parvienne à interpréter et reproduire des mouvements ciliaires actifs observés dans la cochlée de la tortue et du rat conforte ces hypothèses.

Le saccule de la grenouille taureau constitue donc un bon modèle expérimental pour l'étude de l'amplification mécanique par les touffes ciliaires des cellules ciliées de l'oreille interne : la dynamique des mouvements actifs observés sur ces touffes ciliaires peut être ajustée finement par le calcium et/ou des biais statique, et les résultats obtenus sont généralisables à d'autres espèces (tant qu'ils concernent les mouvements ciliaires) et interprétables au travers d'un modèle simple.

¹ Pour citer Geoffrey Manley dans le texte : « Plus ça change, plus c'est la même chose. »

Annexe A. L'oreille interne des mammifères

1. Description

La cochlée humaine présente la forme d'un conduit d'environ 35 mm de long et de section 2 mm² enroulé autour d'un axe osseux (le modiolus) sur environ trois tours d'une spirale, l'ensemble mesurant moins de 1cm³. Ce conduit est lui même subdivisé en trois compartiments. Au centre, la *scala media* est délimitée par la membrane de Reisner et la membrane basilaire. La partie supérieure de ce conduit, la rampe vestibulaire (*scala vestibuli*) est connectée aux osselets de l'oreille médiane par une membrane souple, la fenêtre ovale. La partie inférieure, la rampe tympanique (*scala tympani*) est limitée en sa base par la fenêtre ronde. La membrane basilaire supporte l'organe de Corti, lieu de la transduction mécano-électrique (Figure A.1). Un stimulus sonore entraîne des variations de pression dans la cochlée. Sous son effet, l'Organe de Corti vibre dans un plan transverse à l'axe de la cochlée. Un son pur d'une fréquence donnée ne déplace pas la membrane basilaire en masse, mais met en mouvement seulement une courte longueur de celle-ci. Les sons aigus se traduisent par une vibration de la membrane basilaire dans la région basale de la cochlée, et les graves en son apex.

Dans une section transverse de l'organe de Corti, on trouve plusieurs types cellulaires, dont les cellules ciliées (Figure A.1.C). Ces cellules sont le siège de la transduction mécano-électrique du stimulus sonore en un signal nerveux acheminés ensuite au cerveau par les neurones du nerf auditif auxquelles elles sont connectées. Ce sont des cellules épithéliales très spécialisées, munie d'une touffe ciliaire mécano-sensible (Figure I-3) et dont la structure est détaillée dans la partie I.B.2. La cochlée et les organes du vestibule ont des structures et des fonctions très différentes, mais tous possèdent des cellules ciliées, et leur fonctionnement repose *in fine* sur la déflexion de la touffe ciliaire par les stimuli mécaniques. Dans les canaux semi-circulaires, le fluide qui les emplit agit comme masse inertielle et vient défléchir les touffes ciliaires au niveau de l'ampoule, permettant la détection de l'accélération angulaire de la tête. Dans le saccule et l'utricule, les touffes ciliaires sont connectées à un sac d'otoconies (de petits cristaux de carbonate de calcium) qui joue le rôle de masse inertielle et détectent les accélérations linéaires respectivement verticales et horizontales de la tête.

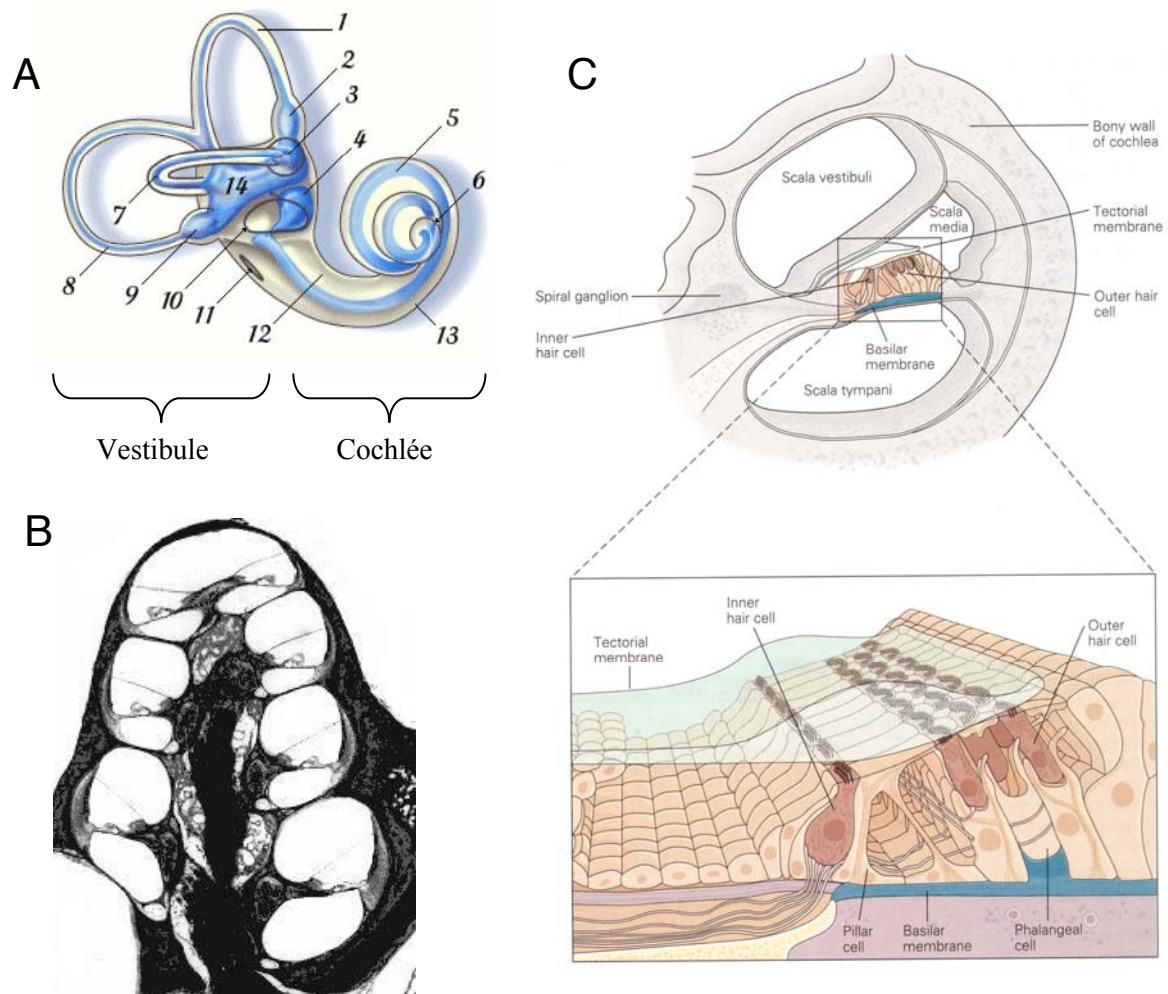


Figure A.1 : **A.** Schéma de l'oreille interne humaine (© Stéphane Blatrix). 1 Canal antérieur - 2. Ampoule (du même canal) - 3. Ampoule (canal horizontal) - 4. Saccule - 5. Canal cochléaire - 6. Cochlée - 7. Canal latéral (horizontal) - 8. Canal postérieur - 9. Ampoule (canal postérieur) - 10. Fenêtre ovale - 11. Fenêtre ronde - 12. Rampe vestibulaire - 13. Rampe tympanique - 14. Utricule. **B.** Section axiale d'une cochlée (© Alec N. Salt, Robert Kimura). On distingue trois tours d'hélices, et dans chaque section la partition cochléaire. **C.** Schéma d'une section de la cochlée, permettant de détailler l'organe de Corti [Hudspeth, 2000].

Dans la cochlée des mammifères, les cellules ciliées se sont différenciées en deux variétés : lorsque l'on s'éloigne du centre de la spirale vers l'extérieur, on rencontre d'abord une cellule ciliée dite « interne », puis un groupe de trois cellules ciliées de même type, appelées cellules ciliées « externes ». Les touffes ciliaires de ces dernières sont connectées à une membrane (la membrane tectoriale), quasi parallèle à la membrane basilaire et qui recouvre tout l'organe de Corti. Les touffes ciliaires des cellules internes sont, elles, libres. Ces cellules sensorielles sont agencées dans une structure très précise par diverses cellules supportrices. Comme le corps cellulaire des cellules ciliées externes est solidaire de la membrane

basilaire et que leur touffe ciliaire est liée à la membrane tectoriale, celles-ci seront défléchies, initiant là encore la mécano-transduction. La touffe ciliaire des cellules ciliées internes n'est pas couplée mécaniquement à la membrane tectoriale ; elles sont défléchies par le mouvement du fluide qui les entoure.

2. Électromotilité des cellules ciliées externes de la cochlée des mammifères

Des observations *in vitro* réalisées sur les cellules ciliées externes extraites de la cochlée des mammifères ont montré que celles-ci avaient la propriété de pouvoir changer la longueur de leur corps cellulaire selon leur potentiel transmembranaire [Brownell *et al*, 1985]. Quand on les dépolarise (respectivement, les hyperpolarise), elles se contractent (respectivement, s'allongent) avec une sensibilité de l'ordre de 20 nm/mV [Ashmore, 1987]. Cette électromotilité somatique pourrait amplifier les mouvements de la membrane basilaire engendrés par un stimulus sonore et pourvoir au processus actif recherché. Elle est le résultat de l'activité d'une protéine que l'on trouve en quantité abondante dans la membrane basolatérale de ces cellules [Kalinec *et al*, 1992], la prestine [Zheng *et al*, 2000]. Un knock-out de cette protéine chez la souris entraîne la perte de cette électromotilité *in vitro* et une élévation du seuil d'audition de 40 à 60 dB *in vivo* [Liberman *et al*, 2002]. Ces résultats font de l'électromotilité un candidat de choix pour être à l'origine de l'amplification dans la cochlée des mammifères.

Plusieurs points empêchent néanmoins de clore le sujet. D'abord, cette motilité est contrôlée par le potentiel transmembranaire, et non par le courant récepteur [Santos-Sacchi & Dilger, 1988]. De par la capacité membranaire, la composante variable du potentiel est filtré au delà d'une fréquence aux alentours du kHz [Santos-Sacchi, 1992], ce qui rend ce mécanisme caduc à haute fréquence. Pour contourner ce problème, Peter Dallos et Burt Evans proposèrent que l'électromotilité soit contrôlée *in vivo* non pas par le potentiel transmembranaire, mais par le potentiel extracellulaire, qui lui n'est pas soumis au filtrage par la membrane [Dallos & Evans, 1995]. Des mesures simultanées de ces potentiels et des mouvements de la membrane basilaire n'infirment pas cette hypothèse [Fridberger *et al*, 2004].

D'autre part, ce mécanisme n'offre pas de sélectivité en fréquence. Des mesures *in vitro* sur les forces qu'il engendre montrent que celles-ci répondent au potentiel transmembranaire indépendamment de la fréquence de stimulation jusqu'à au moins 79 kHz [Frank *et al*, 1999], alors que les caractéristiques de la cochlée signalent l'existence d'une amplification sélective en fréquence. De plus, aucune indication à ce jour ne suggère que ce mécanisme puisse conduire aux émissions

otoacoustiques observées. Enfin, ce processus d'électromotilité n'existe que chez les mammifères, alors que les excellentes caractéristiques de l'audition décrites ci dessus, ainsi que les émissions otoacoustiques, ont été observées chez tous les vertébrés étudiés jusqu'à présent [Manley & Köppl, 1998].

Annexe B. Calibration des fibres

1. Fluctuations de l'extrémité d'une fibre libre

Placé dans un fluide à la température T , l'extrémité libre d'une fibre souple fluctue spontanément sous l'action des chocs moléculaires qui s'exercent sur elle. La mesure de ces fluctuations de position permet de déduire les caractéristiques mécaniques de la fibre. Soit une fibre de raideur K_F dont la base est fixée à la position $\Delta = 0$ dont l'extrémité X est libre de fluctuer. Nous définirons la transformée de Fourier d'une fonction x par :

$$\begin{cases} \tilde{x}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{i\omega t} dt \\ x(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \tilde{x}(\omega) e^{-i\omega t} d\omega \end{cases}$$

Toutes les fonctions $x(t)$ que nous étudierons ici sont des fonctions réelles, donc $\tilde{x}(\omega)$ est telle que $\bar{\tilde{x}}(\omega) = \tilde{x}(-\omega)$ où $\bar{\tilde{x}}$ désigne le complexe conjugué de \tilde{x} .

Si l'on suppose que la fibre est à l'équilibre thermique avec le bain dans lequel elle est plongée, l'amplitude quadratique de ses fluctuations spontanées est telle que

$$1/2 K_F \langle X^2 \rangle = 1/2 k_B T$$

en vertu du théorème d'équipartition de l'énergie. La mesure de cette amplitude donne une première estimation de la raideur de la fibre par $K_F = k_B T / \langle X^2 \rangle$.

Plongée dans un liquide à la température T , l'extrémité de la fibre fluctue sous l'action d'une force stochastique que l'on décrira par la donnée de $\eta(t)$, bruit blanc aléatoire, apparaissant dans l'équation de Langevin. Celle-ci s'écrit

$$0 = -K_F X - \xi_F \dot{X} + \eta(t)$$

soit, dans l'espace de Fourier

$$\tilde{X}(\omega) = \frac{\tilde{\eta}(\omega)}{K_F + i\omega \xi_F}$$

soit

$$\langle |\tilde{X}(\omega)|^2 \rangle = \frac{\langle |\tilde{\eta}(\omega)|^2 \rangle}{K_F^2 + \omega^2 \xi_F^2}$$

Le théorème fluctuation-dissipation spécifie que $\langle |\tilde{\eta}(\omega)|^2 \rangle = 4\pi \xi_F k_B T \delta_D(0)$ où δ_D est la fonction de Dirac. Avec $\delta_D(0) \approx T_{exp}/2\pi$ où T_{exp} est la durée de mesure, il vient pour le spectre $\tilde{C}(\omega)$ de ces fluctuations

$$\tilde{C}(\omega) = \frac{\langle |\tilde{X}(\omega)|^2 \rangle}{T_{exp}} = \frac{2 \xi_F k_B T}{K_F^2 + \omega^2 \xi_F^2}$$

L'ajustement du spectre des fluctuations par une fonction lorentzienne $f = \frac{A}{1 + (\omega/\omega_c)^2}$ donne les paramètres A et ω_c tels que

$$\begin{cases} \omega_c = K_F / \xi_F \\ A = 2 \xi_F k_B T \end{cases}$$

soit

$$\begin{cases} K_F = \frac{\omega_c A}{2 k_B T} \\ \xi_F = \frac{A}{k_B T} \end{cases}$$

ce qui une seconde mesure de K_F et permet en sus d'obtenir une valeur de ξ_F .

2. Calibration expérimentale d'une fibre souple

Pour calibrer sa raideur, une fibre est plongée dans le fluide qui servira pour l'expérience postérieure et son extrémité est imagée sur les photodiodes. Ses fluctuations sont enregistrées (signal filtré à 10 kHz et acquis à 25 kHz) pendant une durée d'environ 1 s et le spectre ainsi que l'amplitude quadratique de ces fluctuations sont calculés. Le spectre est moyenné 10 fois avant son ajustement, et la valeur de la raideur déduite de $\langle X^2 \rangle$ est la moyenne de ces 10 mesures. Une autre estimation de $\langle X^2 \rangle$ est déduite en calculant l'aire sous le spectre moyenné, sur un intervalle de fréquence choisi pour ignorer la contribution de la dérive à basse fréquence (typiquement pour $f < 10$ Hz). La valeur finale de la raideur utilisée est la moyenne de celle déduite de l'ajustement du spectre et celle provenant de l'aire sous le spectre.

La figure B.1 ci-dessous donne un exemple de spectre pour une fibre quelconque. L'ajustement du spectre pour déduire la valeur de K_F présente un certain nombre d'avantages. Cette méthode permet premièrement de déduire la friction sur l'extrémité de la fibre. D'autre part, elle permet de s'affranchir de la dérive (qui apparaît aux basses fréquences ; sur la figure, pour $f < 20$ Hz) et de pics parasites (ici à 90 Hz). L'ajustement permet d'ignorer la dérive en choisissant l'intervalle de fréquence de l'ajustement et minimise l'impact des pics parasites,

alors que ces deux phénomènes sont comptabilisés dans le calcul de $\langle X^2 \rangle$ et conduisent à sous-estimer K_F .

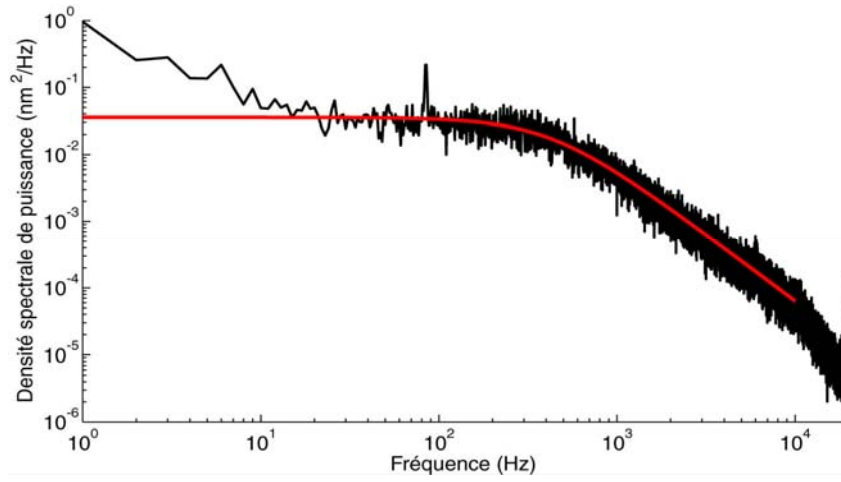
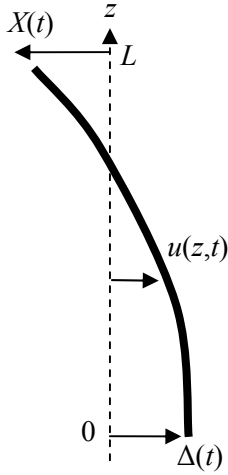


Figure B.1 : Exemple d'un spectre des fluctuations spontanées d'une fibre libre. Signal filtré à 10 kHz, acquis à 25 kHz pendant 1 s et moyenné 10 fois. La courbe rouge est l'ajustement par une lorentzienne (pour les valeurs entre 10 et 10^4 Hz). Valeurs déduites de l'ajustement du spectre : $K_F = 0,099$ pN/nm, $\xi_F = 4,90 \cdot 10^{-5}$ pN.s/nm.

Annexe C. Friction sur une fibre souple

La friction des fibres que nous utilisons pour la micromanipulation mesurée en leur extrémité comporte un terme dû au déplacement de la base de la fibre. Ce déplacement vient limiter l'efficacité de la boucle de rétroaction imposant la position de la touffe ciliaire. Le coefficient de friction associé, ξ'_F , n'est pas trivialement accessible à la mesure. Nous proposons ici une estimation théorique¹ de cette grandeur, ainsi qu'une expérience permettant sa mesure au travers des instabilités d'une boucle de rétroaction.

1. Estimation théorique



On considère une fibre souple de longueur L , que l'on décrit par la donnée de ζ sa friction linéaire et κ sa raideur linéaire, toutes deux uniformes. La déformation de la fibre par rapport à sa position droite est notée $u(z,t)$ et est supposée être petite devant la longueur de la fibre. Son extrémité en $z = 0$ est maintenue à la position $\Delta(t)$ à chaque instant, et est parallèle en cet endroit à l'axe z . L'extrémité $z = L$ est laissée libre et suit la position $X(t)$. On suppose dans un premier temps que la forme $u(z,t)$ de la fibre n'est déterminée que par sa raideur et non par la dissipation visqueuse. L'énergie due à la courbure s'écrit

$$F = \int_{z=0}^L \frac{1}{2} \kappa \left(\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right)^2 dz$$

Pour déterminer $u(z,t)$, on utilise une méthode variationnelle : tout écart du premier ordre δu autour de la position d'équilibre $u(z,t)$ de la fibre entraîne une variation d'énergie qui est au moins du second ordre. On cherche à calculer u pour X et Δ donnés, et donc $\delta u(z=0) = \delta u(z=L) = 0$. Au premier ordre en δu

$$F(u + \delta u) - F(u) = 0$$

soit

$$\int_{z=0}^L \kappa \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \frac{\partial^2 \delta u}{\partial z^2} dz$$

En intégrant par parties, il vient

¹ pour laquelle j'ai grandement bénéficié de l'aide de Jean-François Joanny

$$\int_{z=0}^L -\kappa \frac{\partial^3 u}{\partial z^3} \frac{\partial \delta u}{\partial z} dz + \kappa \left[\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \frac{\partial \delta u}{\partial z} \right]_0^L = 0 \quad (C.1)$$

En $z = 0$, la fibre doit rester parallèle à l'axe z , il doit en être de même pour l'écart δu , donc en ce point $\left. \frac{\partial \delta u}{\partial z} \right|_{z=0} = 0$. D'autre part, comme l'extrémité $z=L$ est laissée

libre, elle n'est pas soumise à un moment, ce qui s'écrit $\left. \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right|_{z=L} = 0$, en

conséquence de quoi, le second terme de l'équation C.1 s'annule. En intégrant le premier par partie, il vient

$$\int_{z=0}^L -\kappa \frac{\partial^4 u}{\partial z^4} \delta u dz - \kappa \left[\frac{\partial^3 u}{\partial z^3} \delta u \right]_0^L = 0 \quad (C.2)$$

Là encore, le second terme de cette équation s'annule en vertu de la condition $\delta u(z=0) = \delta u(z=L) = 0$. Comme l'équation C.2 est valable pour tous les δu satisfaisant les conditions citées plus haut, il vient $\frac{\partial^4 u}{\partial z^4} = 0$, ce qui s'intègre en

$$u = C_3 z^3 + C_2 z^2 + C_1 z + C_0 \quad (C.3)$$

Les conditions aux limites imposent les valeurs des constantes d'intégration :

- 1) $u(z=0) = \Delta \rightarrow C_0 = \Delta$
- 2) $\left. \frac{\partial u}{\partial z} \right|_{z=0} = 0$ (angle à la base fixé à 90°) $\rightarrow C_1 = 0$
- 3) $\left. \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right|_{z=L} = 0$ (pas de moment à l'extrémité) $\rightarrow C_2 = -3C_3 L$
- 4) $u(z=L) = X \rightarrow X = C_3 L^3 - 3C_3 L^3 + \Delta$
soit $C_3 = (\Delta - X)/(2L^3)$

au final :

$$u(z,t) = (\Delta(t) - X(t)) \left(\frac{z^3}{2L^3} - \frac{3z^2}{2L^2} \right) + \Delta(t) \quad (C.4)$$

On fait alors une approximation supplémentaire et l'on utilise cette forme déduite en négligeant les frottements visqueux pour obtenir l'expression de la force visqueuse qui s'exerce sur toute la fibre. Celle-ci s'écrit

$$\begin{aligned} F_v &= - \int_{z=0}^L \xi \frac{\partial u}{\partial t} dz \\ &= - \xi \frac{d}{dt} \int_{z=0}^L u dz \\ &= - \frac{3}{8} L \xi \frac{dX}{dt} - \frac{5}{8} L \xi \frac{d\Delta}{dt} \end{aligned}$$

Par identification, il vient

$$\begin{cases} \xi_F &= \frac{3}{8} L \xi \\ \xi_F' &= \frac{5}{8} L \xi \end{cases}$$

ξ_F' et ξ_F sont donc du même ordre de grandeur. On ne peut pas s'attendre à ce que le terme en Δ dans l'expression de la friction soit négligeable.

2. Utilisation des instabilités de la rétroaction

2.1. Instabilité dans la rétroaction

Supposons que la touffe ciliaire se comporte comme un ressort passif de raideur K_{HB} et de friction ξ_{HB} , couplé à une fibre dont la base Δ est asservie à une position X_C : $\Delta = G (X_C - X)$ au travers d'une boucle de rétroaction de gain G . On suppose d'abord que G est réelle. À $t=0$, on envoie une marche de déplacement $X_C = C^{te}$. L'équation du mouvement de l'extrémité de la fibre s'écrit

$$0 = -(\xi_F + \xi_{HB}) \frac{dX}{dt} - \xi_F' \frac{d\Delta}{dt} - K_{HB} X + K_F (\Delta - X) \quad (C.5)$$

où ξ_F' représente l'effet de la friction visqueuse sur l'extrémité de la fibre due au mouvement de sa base. On suppose dans un premier temps que cette friction est négligeable : $\xi_F' \approx 0$.

Il vient

$$\frac{dX}{dt} + \frac{1}{\tau} X = \frac{K_F G X_C}{\xi_{HB} + \xi_F}$$

avec

$$\tau = \frac{\xi_{HB} + \xi_F}{K_{HB} + (G+1)K_F}$$

Au bout d'un temps long devant τ , qui est une fonction décroissante de G , la position de la touffe ciliaire est $X = X_C \frac{G K_F}{K_{HB} + (G+1)K_F}$, qui tend vers X_C lorsque

G devient grand. On a bien dans cette situation une boucle de rétroaction qui parvient à imposer la position de la touffe ciliaire.

Si l'on suppose maintenant que la friction ξ_F' n'est plus négligeable, et que l'on tente d'imposer $X_C = 0$, il vient

$$\frac{dX}{dt} + \frac{1}{\tau} X = 0$$

avec

$$\tau = \frac{\xi_{HB} + \xi_F - G \xi_F'}{K_{HB} + (G+1)K_F}$$

On voit avec cette écriture que X diverge dès que

$$G > \frac{\xi_{HB} + \xi_F}{\xi_F'}$$

ξ_F' , ξ_F et ξ_{HB} sont du même ordre de grandeur (voir ci-dessus) ; on ne peut donc pas espérer avoir un gain important, ce qui est pourtant nécessaire pour une boucle de rétroaction efficace. Le terme en ξ_F' provient de la dérivée temporelle de Δ dans l'équation C.5, et ce problème est donc propre à la technique de micromanipulation par des fibres ; une autre technique faisant appel par exemple à une pince optique en serait affranchie.

2.2. Méthode et analyse pour la mesure de la friction d'une fibre

Cette instabilité est exploitable pour obtenir une mesure de ξ_F' . On place une fibre libre sous le microscope au sein de l'appareillage expérimental, et on impose sa position au moyen du module PID, uniquement en se servant du gain proportionnel P de ce circuit. On modélise ce circuit électronique ainsi que le filtre qui affecte le signal indiquant la position de l'extrémité de la fibre par une fonction de transfert unique \underline{H} , de phase φ et de module G , proportionnel au gain de P, noté A . Une instabilité de la boucle de rétroaction se manifeste par des oscillations apparaissant pour une certaine valeur de A , à la pulsation ω . On suppose que l'on a déterminé sa raideur K_F et son coefficient de friction primaire ξ_F au moyen du spectre de ses fluctuations, et l'on essaye d'en déduire le coefficient de friction secondaire ξ_F' connaissant ω . Dans la suite, on notera \tilde{X} , \tilde{X}_C et $\tilde{\Delta}$ la représentation complexe de la tension correspondant respectivement à l'extrémité de la fibre, la position de commande (que l'on prendra égale à 0) et la position de la base de la fibre.

Le PID et le filtre imposent la position de la base de la fibre

$$\tilde{\Delta} = \underline{H}(\tilde{X}_C - \tilde{X}) = -\underline{H}\tilde{X}$$

et d'autre part, l'équation du mouvement de la fibre s'écrit

$$\begin{aligned} 0 &= K_F(\tilde{\Delta} - \tilde{X}) - j\omega\xi_F\tilde{X} - j\omega\xi_F'\tilde{\Delta} \\ &= [K_F(\underline{H} + 1) + j\omega(\xi_F - \xi_F'\underline{H})]\tilde{X} \end{aligned}$$

Pour la pulsation où apparaissent les oscillations, le premier terme du produit s'annule. En séparant partie réelle et partie imaginaire il vient pour cette pulsation

$$\begin{cases} 0 &= K_F(\text{Re}(\underline{H}) + 1) + \omega\xi_F \text{Im}(\underline{H}) \\ 0 &= K_F \text{Im}(\underline{H}) + \omega(\xi_F - \xi_F' \text{Re}(\underline{H})) \end{cases}$$

Ce système de deux équations linéaires indépendantes en $\text{Re}(\underline{H})$ et $\text{Im}(\underline{H})$ se résout en

$$\begin{cases} \text{Re}(\underline{H}) &= \frac{\omega^2 \xi_F' \xi_F - K_F^2}{\omega^2 \xi_F'^2 + K_F^2} \\ \text{Im}(\underline{H}) &= -K_{SF} \omega \frac{\xi_F + \xi_F'}{\omega^2 \xi_F'^2 + K_F^2} \end{cases}$$

Le rapport $\tan \varphi = \frac{\text{Im}(\underline{H})}{\text{Re}(\underline{H})}$ est indépendant de A . Il vient au final

$$\xi_F' = K_F \frac{K_F \tan \varphi - \xi_F \omega}{\omega^2 \xi_F \tan \varphi + K_F \omega}$$

Le principe de la mesure consiste donc à mesurer la pulsation à laquelle apparaissent les oscillations lorsque l'on fait croître le gain A , à calculer $\tan \varphi$ connaissant \underline{H} , et à en déduire ξ_F' connaissant ξ_F et K_F grâce au spectre des fluctuations de l'extrémité de la fibre.

2.3. Mesures

Nous avons appliqué cette méthode à différentes fibres et pour une même fibre, pour différent filtre, ce qui change l'expression de \underline{H} et la pulsation à laquelle apparaissent les oscillations. La dispersion des résultats pour une même fibre est probablement le reflet d'une dépendance du coefficient de friction en la fréquence. Auquel cas, les valeurs numériques données ne sont plus rigoureusement valides : on a utilisé pour les obtenir une valeur de ξ_F déterminée à partir de tout le spectre des fluctuations de la fibre et non sa valeur à la fréquence d'intérêt, comme supposé dans le calcul ci-dessus. Néanmoins, les valeurs obtenues permettent de valider l'approche théorique vue au 1 et de donner à ce coefficient un ordre de grandeur.

N° fibre	K_F (pN.nm ⁻¹)	ζ_F (pN.s.nm ⁻¹)	Type de filtre	ω (rad.s ⁻¹)	ζ'_F (pN.s.nm ⁻¹)
1	0,399	$1,22 \cdot 10^{-4}$	passe-bas monopole $f_c = 64$ Hz	1753	$8,33 \cdot 10^{-4}$
2	0,194	$7,4 \cdot 10^{-5}$	passe-bas monopole $f_c = 64$ Hz	1558	$4,53 \cdot 10^{-4}$
			Bessel passe-bas 8 pôles $f_c = 100$ Hz	279,6	$2,15 \cdot 10^{-4}$
3	0,344	$1,22 \cdot 10^{-4}$	Bessel passe-bas 8 pôles $f_c = 200$ Hz	508,9	$1,88 \cdot 10^{-4}$
			Butterworth passe-bas 8 pôles $f_c = 200$ Hz	584,3	$1,68 \cdot 10^{-4}$
			passe-bas monopole $f_c = 64$ Hz	1696	$3,23 \cdot 10^{-4}$
			Bessel passe-bas 8 pôles $f_c = 2$ kHz	2136	$5,21 \cdot 10^{-4}$
			Butterworth passe-bas 8 pôles $f_c = 2$ kHz	2262	$1,02 \cdot 10^{-3}$
			Bessel passe-bas 8 pôles $f_c = 20$ kHz	20106	$8,43 \cdot 10^{-6}$
			Butterworth passe-bas 8 pôles $f_c = 20$ kHz	20735	$1,06 \cdot 10^{-5}$

Tableau C.1 : Mesures de la friction sur une fibre souple

Annexe D. Hystérésis de l'élément piézoélectrique du stimulateur

Comme tous les matériaux ferroélectriques, les éléments piézoélectriques souffrent du phénomène d'hystérésis. Celui-ci se manifeste par des déplacements qui ne sont pas fidèles à la tension de commande, et dont l'amplitude dépend des commandes antérieures. Lors de nos expériences, nous imposons typiquement une série de marches alternées d'amplitude croissante. L'hystérésis se manifeste entre autres par le retour de la base de la fibre à une position différente de zéro après l'application de la marche (Figure D.1). Dans le cas des marches de grande amplitude, cette erreur n'est pas négligeable (elle de l'ordre de 15% pour les déplacements de la base de plus de 500 nm). Pour les déplacements plus faibles, elle est plus modérée (Figure D.2). Ceux-ci sont gênants pour les grands déplacements de la base de la fibre : après une marche de grande amplitude X_{max} , la base de la fibre ne revient pas en $X=0$, et la prochaine déflexion se fait à partir de cette position biaisée. Les touffes ciliaires que nous étudions possèdent un mécanisme d'adaptation qui les ramène dans leur état au repos même en présence d'une déflexion statique, et qui vient donc limiter les effets néfastes de cette erreur.

Supposons que l'on veuille appliquer une série de marches alternées d'amplitude maximale $X = 100$ nm à une cellule modélisée par une raideur linéaire $K_{HB} = 1$ pN/nm avec une fibre de raideur $K_F = 0,4$ pN/nm. Ceci correspond à un déplacement maximal de la base de la fibre de $\Delta = 350$ nm. Après la dernière marche positive, le stimulateur reviendra à la position $\Delta = 33,5$ nm (voir la figure D.1), et la cellule, supposée revenir en $X=0$ entre deux marches, en sera éloignée de 10 nm et soumise à une force statique de 10 pN. De plus, lors de la marche suivante (qui est dans le cas d'une série alternée la dernière marche négative), le déplacement de la fibre se fera à partir de la position $\Delta = 33,5$ nm et non en 0.

Si on laisse suffisamment de temps entre chaque marche, l'adaptation parvient à diminuer ce biais, mais celui-ci limite la précision que l'on peut espérer lors des mesures impliquant la détermination de la position du moteur de l'adaptation. Une solution serait d'utiliser l'élément piézoélectrique du stimulateur en boucle fermée : une jauge de contrainte qui lui est intégré couplée à une boucle de rétroaction parvient à lui imposer une position et compense à la fois les effets de l'hystérésis et ceux de la température. Malheureusement, le temps de montée d'une marche est alors de 30 ms, ce qui n'est pas acceptable pour nos expériences.

Dans le cas d'une série alternée, l'erreur au retour est sensiblement une fonction impaire de l'amplitude imposée. Ceci a pour conséquence qu'après une marche positive et une marche négative de même amplitude, on est revenu à la position $\Delta = 0$ nm (moins les erreurs dues à la dérive, voir Figure D.3). Cette erreur

due à l'hystérésis est donc la plus défavorable au moment d'imposer la marche négative qui suit la marche positive de même amplitude.

Dans le cas de séries non alternées, il semble que cette erreur de retour soit moindre pour les grands déplacements (Figure D.4). Mais de ce cas, les erreurs au retour s'accumulent le long de la série ; on préférera stimuler la cellule par des marches alternées. On remarque d'autre part sur ces traces que la position est soumise à une légère dérive, et ce même avec une fibre très courte et très rigide : ainsi sur cette même courbe, on peut voir sur le graphe B que la position mesurée juste après la marche n'est pas la même que celle mesurée juste avant la marche suivante (dans le cas de la Figure, ces mesures sont séparées de 80 ms). Il est probable que ce phénomène provienne également du fonctionnement du piézoélectrique. Elle reste bien inférieure à la dérive que l'on observe dans le cas d'une expérience sur tissu biologique et n'est pas critique pour nos applications.

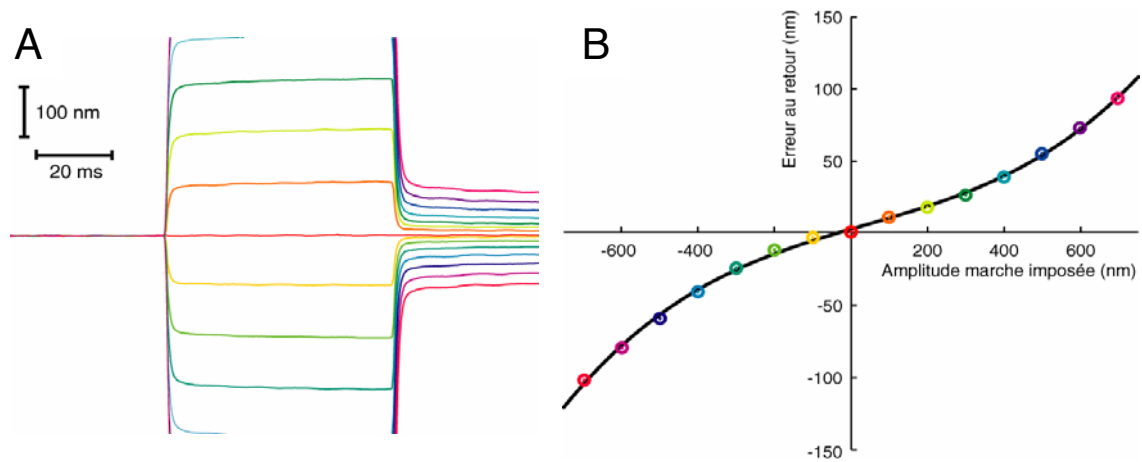


Figure D.1 : **A.** Déplacement mesurés avec une fibre courte et rigide pour une série de marche d'amplitude maximale 700 nm espacées de 100 nm. Le signal mesuré par les photodiodes sature avant d'arriver à 700nm. La ligne de base de chaque marche a été remplacée en $X=0$. **B.** Tracé de l'erreur au retour en fonction de l'amplitude du déplacement imposé. Courbe noire : ajustement par $y = 1,3 \cdot 10^{-7} x^3 - 1,6 \cdot 10^{-5} x^2 + 7,7 \cdot 10^{-2} x + 2,9$.

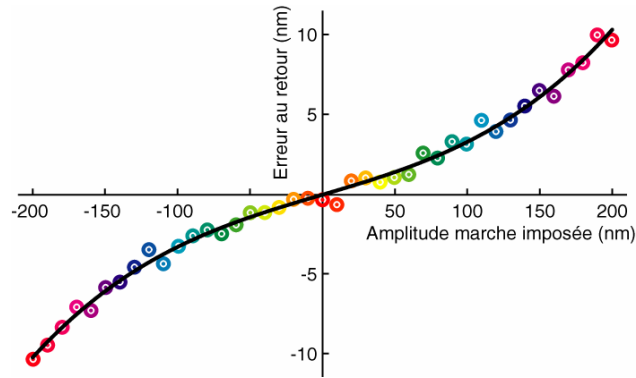


Figure D.2 : Erreur mesurée dans des conditions identiques à celles du graphe précédent, pour une amplitude maximale de 200nm. L'erreur au retour maximale ne représente plus que 5%. Courbe noire : ajustement par $y = 6,2 \cdot 10^{-7} x^3 + 1,7 \cdot 10^{-5} x^2 + 2,7 \cdot 10^{-2} x - 4,5 \cdot 10^{-2}$.

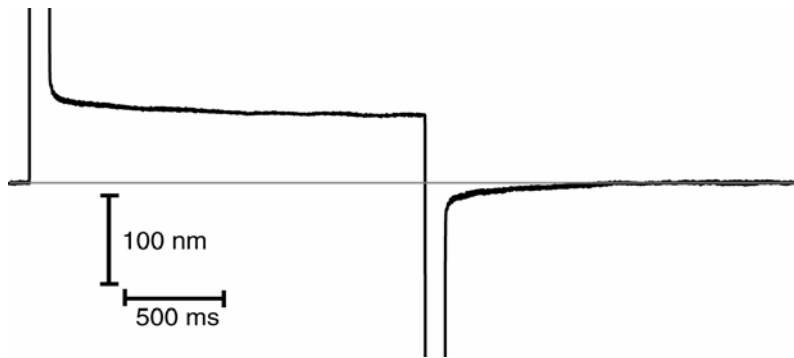


Figure D.3 : Erreur au retour pour deux marches successives alternées d'amplitude 700 nm.

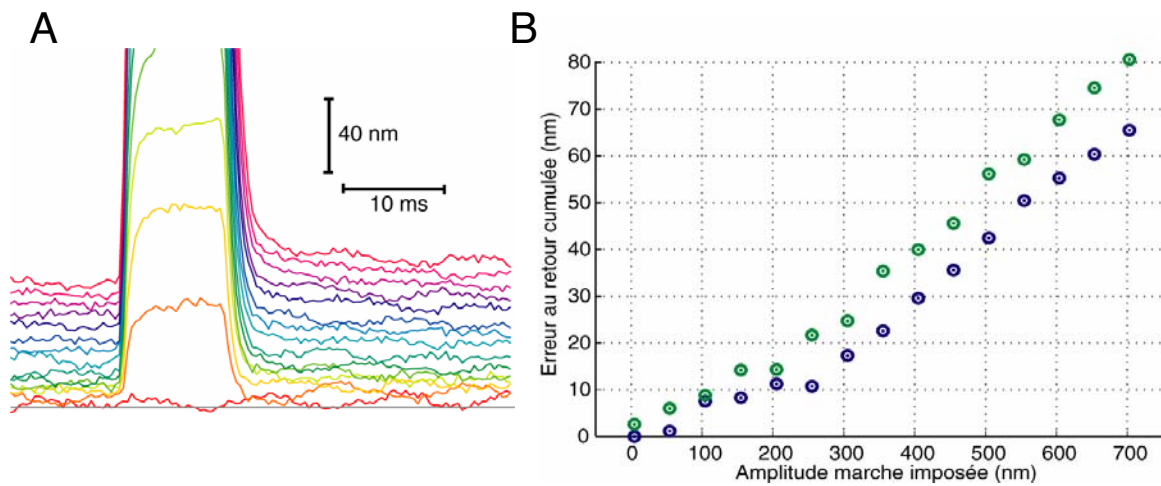


Figure D.4 : **A.** Erreur au retour cumulée dans le cas d'une série de marches non alternées. **B.** Position absolue au cours de cette mesure. • : position mesurée 5 ms avant la marche ; • : position mesurée 5 ms après la marche.

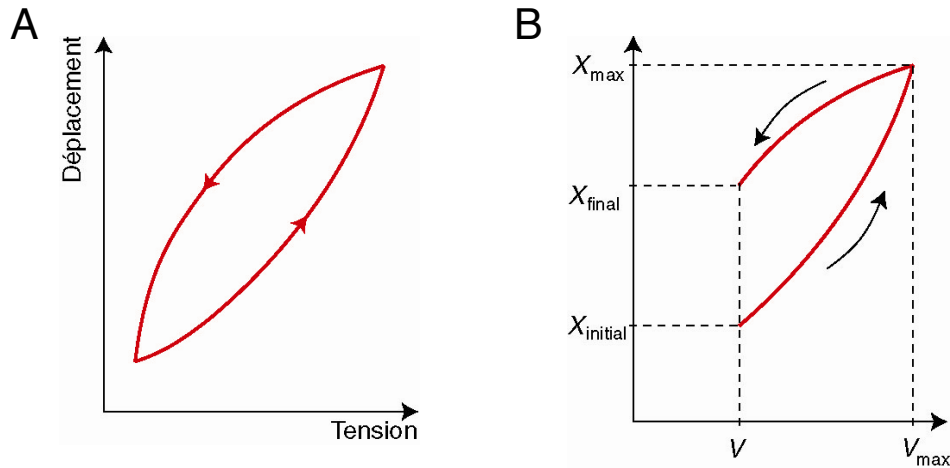


Figure D.5 : **A.** Courbe classique d'étalonnage pour un élément piézoélectrique. **B.** Trajet sur cette courbe pour une marche de tension positive.

On peut tenter d'expliquer ces erreurs par le phénomène d'hystérésis du matériau ferroélectrique. Le constructeur donne une courbe d'étalonnage position/tension pour chacun de ses piézoélectrique. Celle-ci présente une forme en olive lorsque l'on fait varier la tension de 0 jusqu'au maximum, puis que l'on revient à 0 (Figure D.5.A) ; la position n'est pas la même pour une tension donnée selon l'histoire de matériau. C'est ce qui se produit lorsque l'on effectue une marche ; le matériau n'emprunte pas le même chemin pour revenir, et l'on se retrouve avec une position différente lorsque l'on revient à la tension initiale. Comme le cycle est parcouru dans le sens trigonométrique, on a une position finale plus haute que la position initiale dans le cas d'une marche positive (Figure D.5.B).

Le moyen idéal de compenser ces erreurs est de faire fonctionner l'élément en boucle fermée. Mais la boucle de rétroaction qui équipe le notre est trop lente pour être employée dans nos mesures. Le PID permet de s'en affranchir également : on travaille à position imposée. La contrepartie est qu'alors c'est notre mesure de force qui est entachée par l'hystérésis : pour obtenir la force imposée à la cellule, on calcule $F = K_F (\Delta - X)$, où X est la position de l'extrémité de la fibre effectivement mesurée, et Δ est la position de la base de la fibre, obtenue dans notre cas par la mesure de la tension envoyée au piézoélectrique, et donc soumise aux erreurs dues à l'hystérésis. Il faudrait connaître précisément la relation entre la position et la tension imposée, ce qui n'est pas possible puisque la position n'est pas une fonction (au sens mathématique) de la tension.

Annexe E. Algorithme d'analyse des oscillations

Nous avons mis au point un algorithme, présenté au paragraphe II.C.4, permettant la mesure des caractéristiques des oscillations spontanées. Celui-ci est utilisé sur des enregistrements d'oscillations spontanées de touffes ciliaires soumises à une modification de $[Ca^{2+}]$ par iontophorèse. Afin de valider cet algorithme et de s'assurer qu'il n'est pas une source d'artefacts dans les mesures qu'il donne, nous avons simulé numériquement un grand nombre de cycle d'oscillations en présence d'une concentration de calcium variable (simulée par des valeurs de S différentes) à partir des équations du paragraphe I.F, supposant donc que la forme des courbes force/déplacement ne change pas avec cette concentration.

Les paramètres utilisés sont donnés dans le tableau B de l'annexe G ; les paramètres λ_a et λ ont été choisis tels que la forme des oscillations soit nettement biphasiques ($\lambda_a/\lambda \approx 100$). Dans le cas où la simulation ne tient pas compte du bruit, et sur toute la gamme de S pour laquelle des oscillations sont observables (0,75-1,5), on voit que l'amplitude des sauts abrupts détectée par l'algorithme croît légèrement avec S : entre les deux extrêmes, on trouve une augmentation de 2 % pour les sauts négatifs et 3 % pour les sauts positifs (Figure E.1.A). Cette croissance avec S est prévisible : comme la cinétique de la phase lente est déterminée par la vitesse du moteur de l'adaptation et que celle-ci est d'autant plus rapide lors de son glissement que le calcium est élevé, l'algorithme va attribuer au saut abrupt une part croissante du mouvement de la touffe ciliaire dû à la phase lente. De manière cohérente, si l'on reproduit ce test avec un rapport λ_a/λ ne valant plus que 10, les deux phases lentes et rapides sont moins bien discriminables et l'algorithme donne une surestimation maximale de 20 % pour les sauts positifs, et 3 % pour les sauts négatifs. Il faut donc, pour pouvoir utiliser l'algorithme dans nos expériences, choisir des oscillations où l'on distingue nettement la phase lente des sauts rapides.

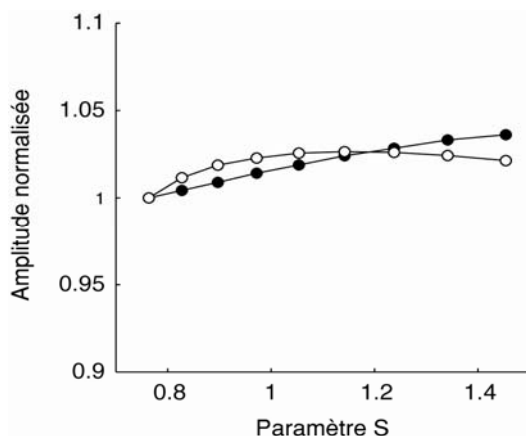
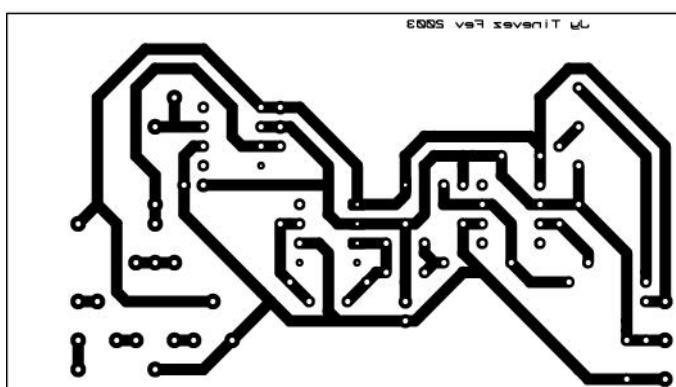


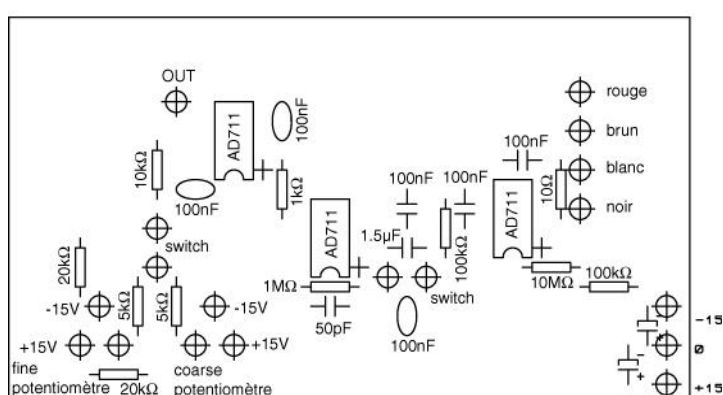
Figure E.1 : Amplitude des sauts abrupts des oscillations spontanées, simulées numériquement avec les paramètres donnés dans la colonne B du

tableau de l'annexe G ; ● : amplitude des sauts positifs ; ○ : amplitude des sauts négatifs.

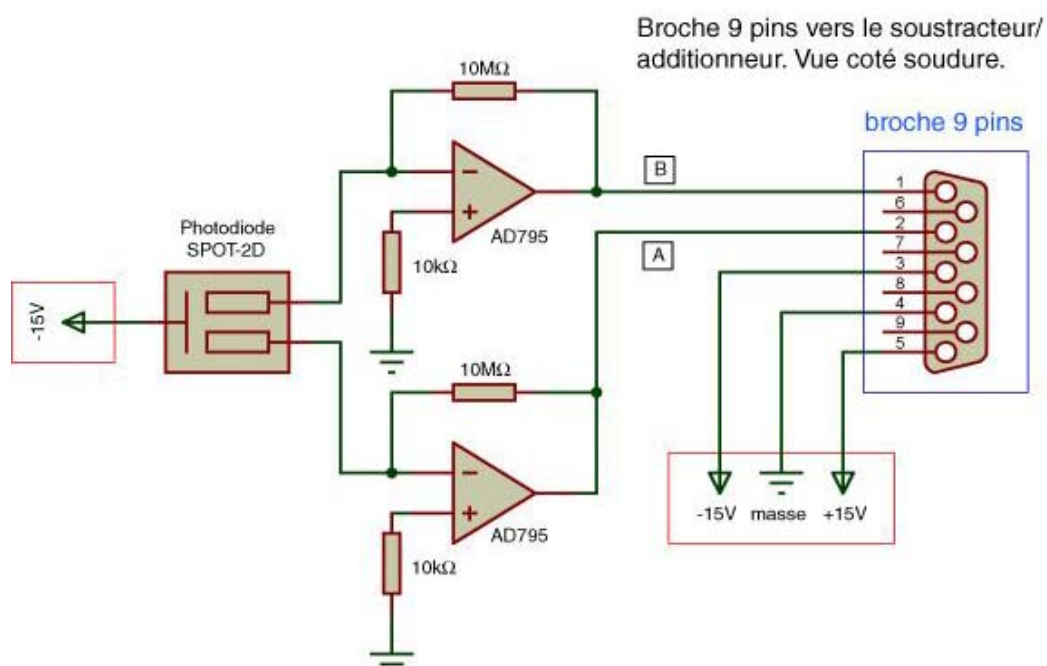
Bottom copper (éch 1/1)



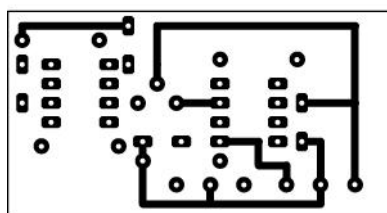
Top silk (éch 1/1)



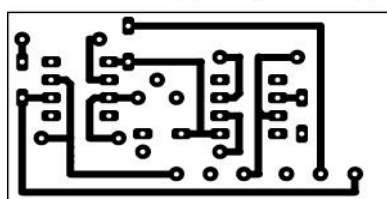
2. Préamplificateur photodiode



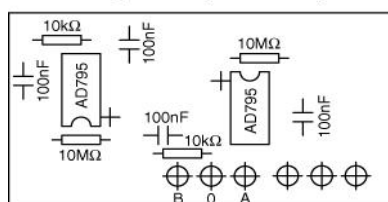
Top copper (éch 1/1)



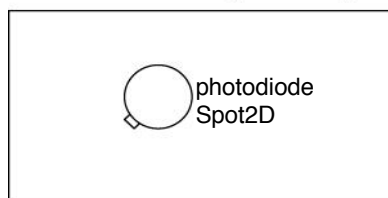
Bottom copper (éch 1/1)



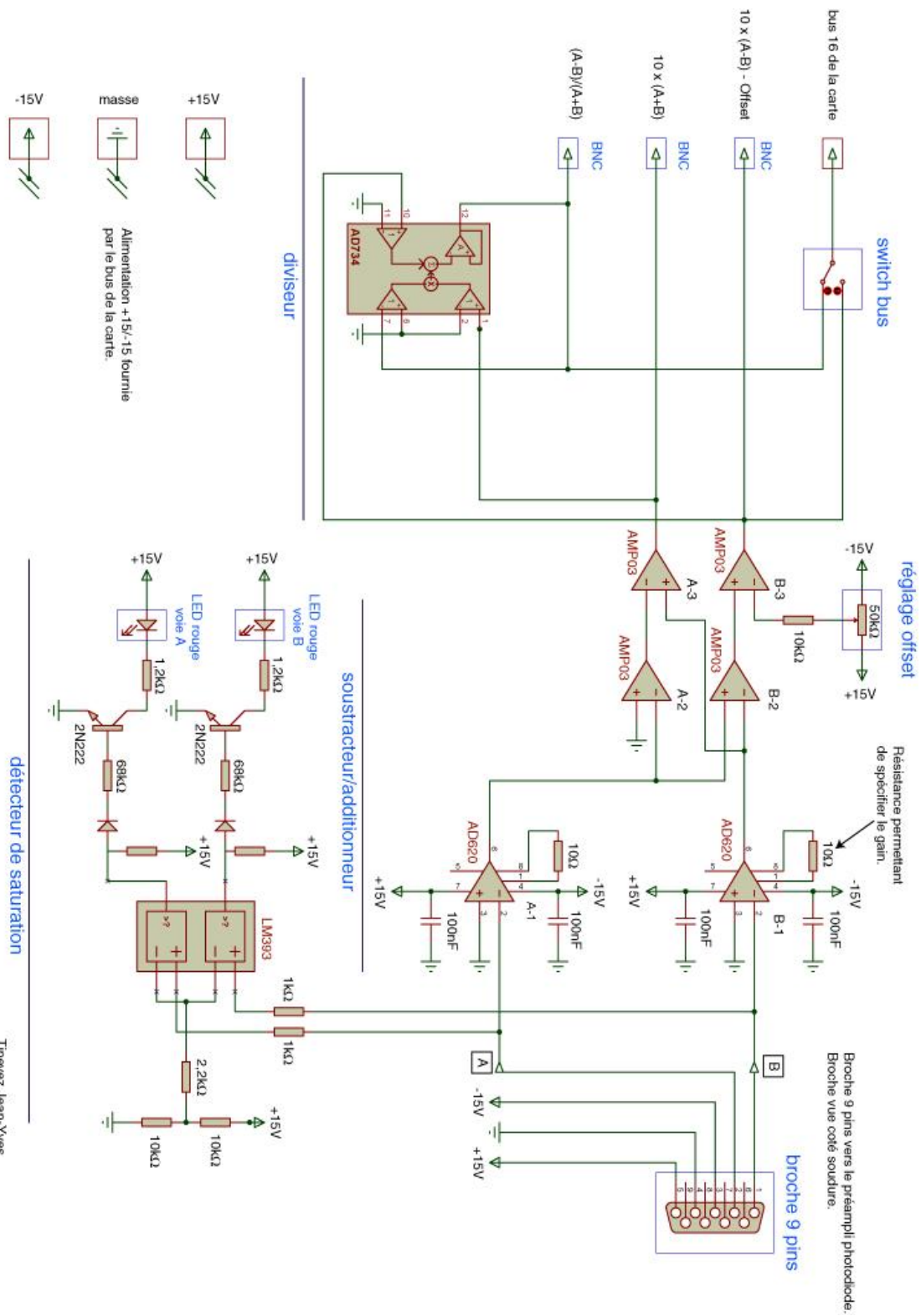
Top silk (éch 1/1)



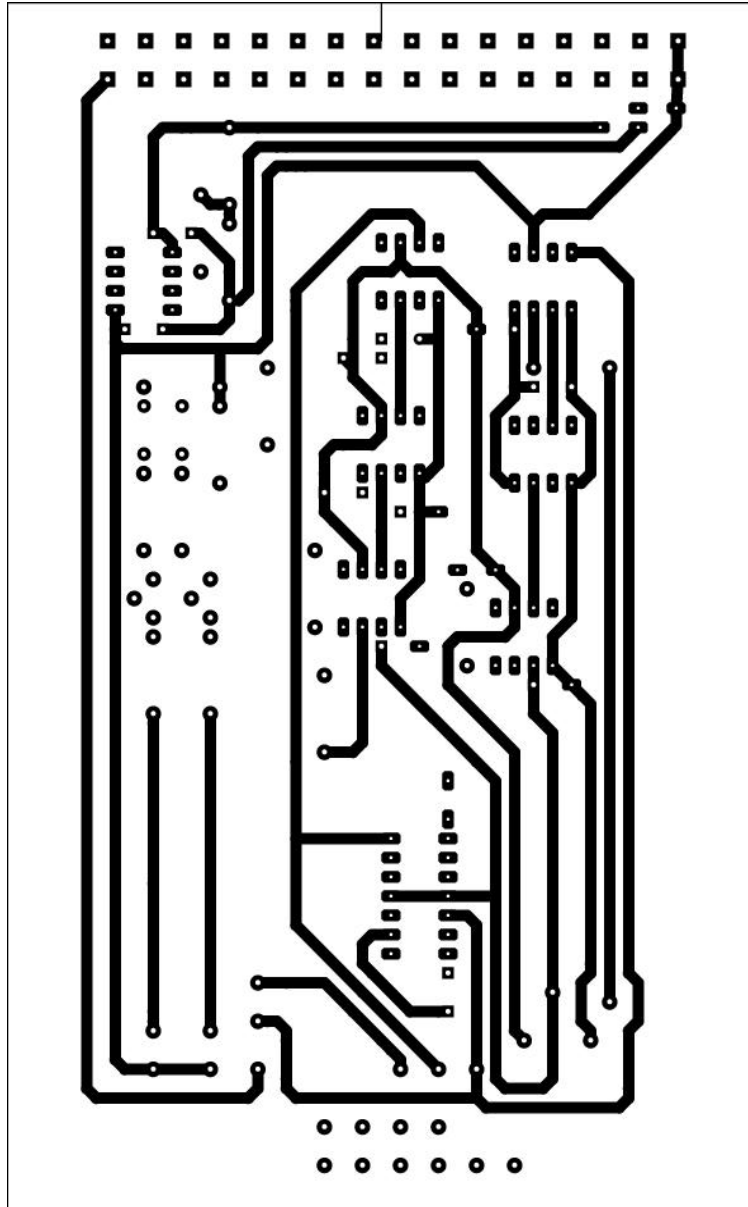
Bottom silk (éch 1/1)

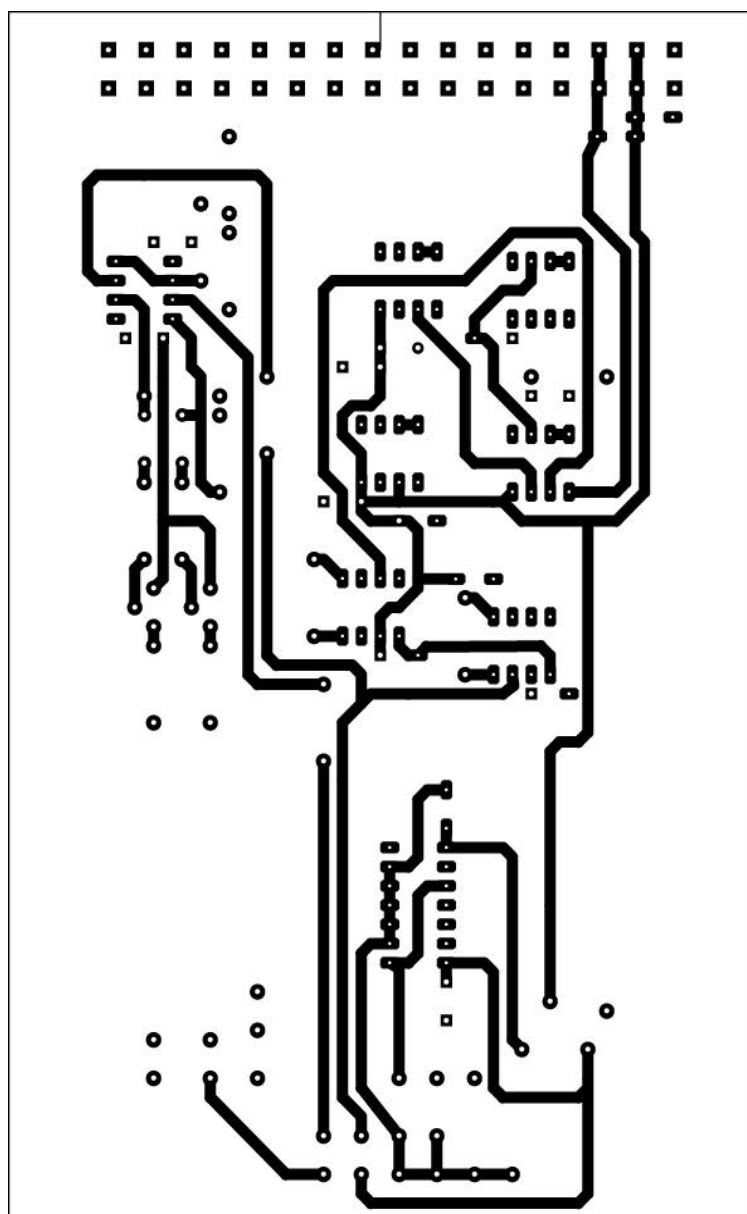


3. Additionneur/soustracteur/diviseur sur carte Europe



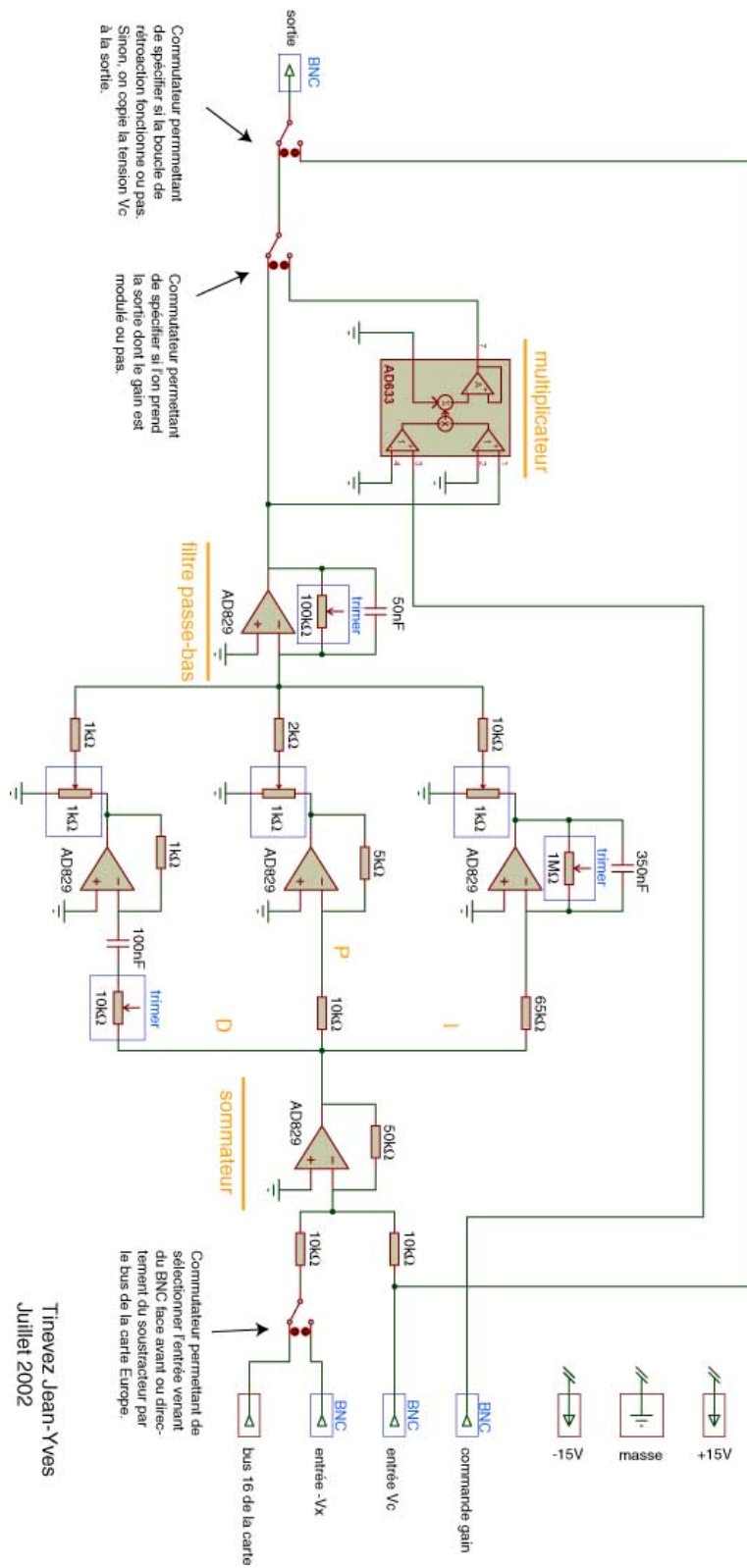
Top copper (éch 1/1)





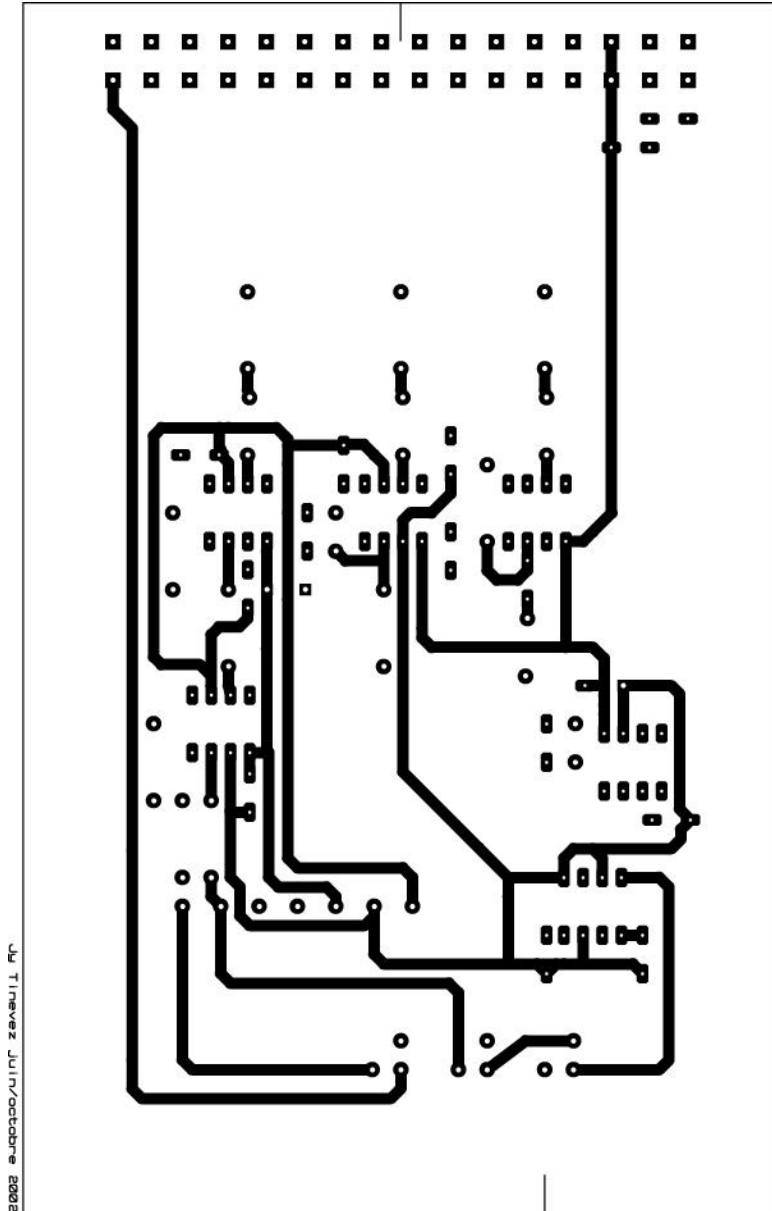
Bottom copper (éch 1/1)

4. Boucle de rétroaction PID sur carte Europe

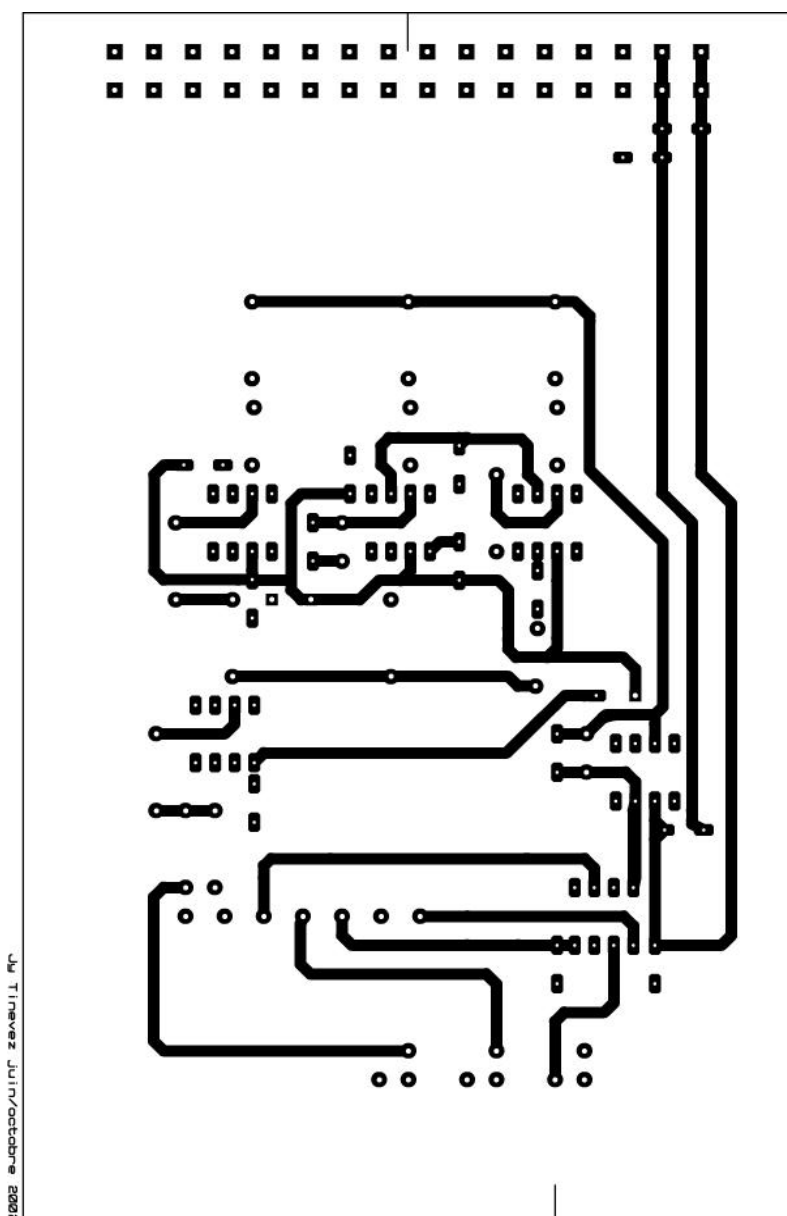


Tinevez Jean-Yves
Juillet 2002

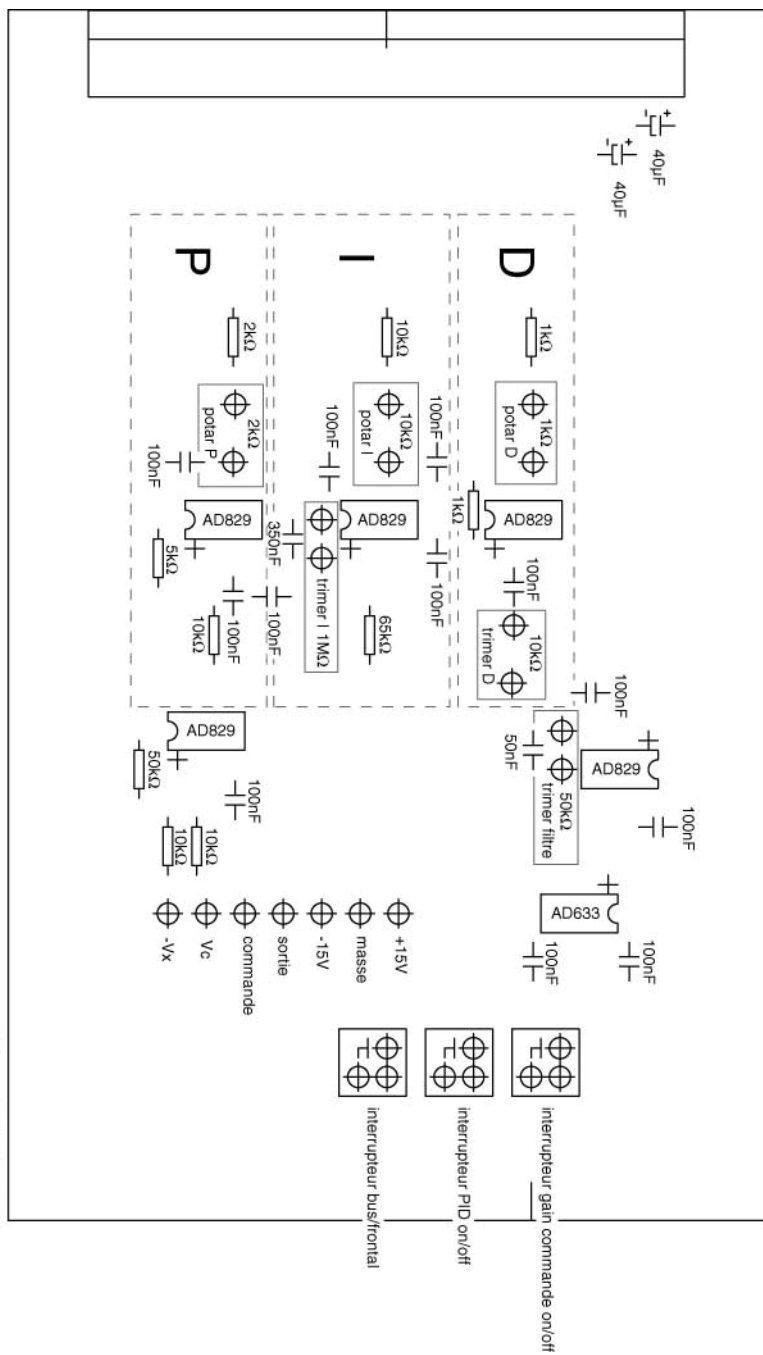
Top copper (éch 1/1)



Bottom copper (éch 1/1)



Top silk (éch 1/1)



Jy Tinevez juin/octobre 2002

Les références des composants utilisés sont données en cote sur les typons (*Analog devices*)

Voltage clamp pour mesure de courant transépithélial : Quatre électrodes sont branchées sur un premier circuit permettant d'imposer une différence de potentiel nulle entre le compartiment du bas (coté nerf pour la préparation, connecteurs noir et blanc) et le compartiment du haut (coté touffes ciliaires, connecteurs rouge et brun). Le courant nécessaire pour maintenir cette différence de potentielle nulle est amplifiée par un convertisseur courant tension de gain 10^7 V.A^{-1} , puis envoyé sur un filtre permettant au choix de couper la composante continue du signal. Un dernier étage permet d'ajouter une tension d'offset réglable grossièrement et finement à l'aide de deux potentiomètres.

Préamplificateur photodiodes : Schéma de principe du circuit convertisseur courant/tension sur lequel est fixé la paire de photodiode. L'alimentation est fournie par un câble 9 broches connecté à une carte Europe, qui se charge également de l'acheminement des signaux A et B.

Carte Europe additionneur/soustracteur/diviseur : Schéma de principe de la carte Europe réalisant le traitement du signal généré par les convertisseurs courant/tension couplés aux photodiodes. Les connexions sur la face avant sont dénotées par un encadré bleu ; celles sur le bus de la carte le sont par des encadrés rouges. Les signaux A et B, tout deux négatifs, sont d'abord comparés à une tension de référence (environ -12V) afin d'être sûr que le préamplificateur ne sature pas (les mesures ne sont pas valides sinon). Si l'une des voies sature, une LED s'allume. Les signaux sont d'abord amplifiés avec un gain $\times 10$ (AD620) puis les opérations de soustraction et d'addition sont réalisées (AMP03). On ajoute un offset réglable par un trimmer sur la sortie A-B. Les sorties A-B, A+B et $(A-B)/(A+B)$ sont disponibles sur la face avant par des connecteurs BNC. Un commutateur permet de spécifier si l'on envoie sur le bus de la carte la voie A-B ou la voie divisée. Cette sortie sera récupérée par la carte Europe du PID. Les entrées A et B se font au travers d'une fiche 9 broches branchée sur le circuit des préamplificateurs qui permet également de l'alimenter.

Boucle de rétroaction à PID sur carte Europe : Carte Europe contenant la boucle de rétroaction PID. Trois potentiomètres permettent de régler la proportion de signal proportionnel (P), intégré (I) et dérivé (D) on veut ajouter pour composer le signal d'erreur. Les constantes de temps de l'intégration et de la dérivation sont réglables par deux trimmers.

-
- $-V_x$: Grandeur sur laquelle se fait la rétroaction, donnée par le circuit soustracteur/additionneur. Un commutateur permet de spécifier si l'on prend cette entrée sur la face avant ou par le bus de la carte.
 - V_C : Tension de commande de la boucle, spécifiée par LabView.
 - **commande gain** : Permet d'échelonner le gain et de contrôler la « force » de la boucle de rétroaction. Lorsque le PID fonctionne et que le commutateur de la commande est enclenché, le signal d'erreur est multiplié (AD633, sature à 1 V) par cette tension divisée par 10.
 - **sortie** : Tension de sortie, qui sert de commande au stimulateur piézoélectrique. Lorsque le PID est éteint, cette sortie recopie simplement la tension de commande V_C .¹

¹ Tous ces schémas sont adaptés de ceux qui nous ont généreusement été donnés par Jim Hudspeth (Université Rockefeller, New York, Etats-Unis), notamment le PID, fruit du travail postdoctoral d'Amit Metha dans ce laboratoire. J'ai également bénéficié de l'aide précieuse de Jean-Hugue Codarbox de l'atelier d'électronique de l'Institut Curie, qui m'a formé à la conception et à la gravure des cartes électroniques.

Annexe G. Table et définition des notations utilisées

On donne dans cette annexe la définition des notations utilisées tout au long de cette thèse pour la description physique de la touffe ciliaire. Autant que possible, cette définition est choisie proche de celle trouvée dans les récentes publications du domaine. Comme signalé dans le paragraphe I.C.5, nous utilisons deux axes différents pour mesurer les déplacements et les forces (Figure G.1). D'une part on dispose de l'axe donné par la direction des stéréocils et dirigé vers leurs racines. Cet axe est l'axe naturel pour décrire le changement conformationnel dû à l'ouverture du canal et le mouvement du moteur de l'adaptation. Les grandeurs exprimées selon cet axe sont dénotées par une lettre minuscule. D'autre part, toutes nos mesures mécaniques sont réalisées selon l'axe de stimulation, au sommet de la touffe ciliaire, selon l'axe horizontal contenu dans le plan symétrie bilatérale de la touffe ciliaire (voir le paragraphe I.C.1) ; les grandeurs qui s'y rapportent sont dénotés par une lettre majuscule. Il est possible d'exprimer une grandeur qui se rapporte à un axe en fonction de la même grandeur rapportée à l'autre axe, au travers d'un paramètre géométrique γ , qui varie selon l'organe et l'animal étudié (voir le paragraphe I.C.5). Une distance l mesurée le long des stéréocils correspondra à une distance L selon l'axe de stimulation telle que $l = \gamma L$, pour une force $f = F/\gamma$, et pour une raideur $k = K/\gamma^2$.

Notation	Définition	Expression	Renvoi
F_{ext}	Force extérieure.		I.C.1
K_F	Raideur de la fibre utilisée pour stimuler la touffe ciliaire.		I.E
N	Nombre de complexes de transduction d'une touffe ciliaire.		I.E.2
P_o	Probabilité d'ouverture des canaux d'une touffe ciliaire.		I.C.3
$\Delta\mu$	Différence d'énergie libre intrinsèque entre l'état ouvert et l'état fermé du canal.		I.C.3
$k_B T$	Constante de Boltzmann \times Température en Kelvin.		
K_{SP}	Raideur combinée des pivots des stéréocils, mesurée selon l'axe de stimulation.		I.E.1
X_{SP}	Extension au repos des ressorts des pivots, mesurée selon l'axe de stimulation.		I.G.1
k_{GS}	Raideur d'un ressort de transduction suivant son axe.		I.C.3
K_{GS}	Raideur combinée de tous les ressorts de transduction d'une touffe ciliaire, mesurée selon l'axe de stimulation.	$K_{GS} = N \gamma^2 k_{GS}$	I.E.1
d	Diminution de l'extension d'un ressort de transduction lorsque le canal auquel il est lié s'ouvre, mesurée suivant l'axe du ressort.		I.C.3
D	Distance mesurée selon l'axe de stimulation tel qu'un mouvement D de la touffe ciliaire provoque un changement d de la longueur du ressort de transduction.	$D = d / \gamma$	I.G.1
x_r	Extension au repos du ressort de transduction, pour un canal à mi-chemin entre l'état ouvert et l'état fermé.		I.C.3
X	Déflexion de la touffe ciliaire, mesurée selon l'axe de stimulation et par rapport à sa position dans l'état stationnaire ($F_{ext} = 0$).		I.C.1
x	Extension du ressort de transduction induite par la déflexion de la touffe ciliaire X .	$x = \gamma X$	I.C.3
\bar{X}	Position de la touffe ciliaire selon l'axe de stimulation et mesurée par rapport à la position X_{SP} .	$\bar{X} = X - X_{SP}$	I.G.1
x_a	Mouvement du moteur de l'adaptation, mesurée le long de l'axe des stéréocils et par rapport à sa position dans l'état stationnaire au repos.		I.D.5.3
X_a	Glissement adaptatif de la relation courant/déplacement de la touffe ciliaire, selon l'axe des déplacements X et par rapport à l'état stationnaire au repos.	$X_a = x_a / \gamma$	I.D.5.3
\bar{X}_a	Position du moteur de l'adaptation mesurée le long de l'axe de stimulation, et par rapport à la position $x_r/\gamma - D/2 - X_{SP}$.	$\bar{X}_a = X_a - x_r / \gamma - D / 2 - X_{SP}$	I.G.1
Y	Extension des ressorts de transduction, mesurée selon l'axe de stimulation.	$Y = \bar{X} - \bar{X}_a - D P_o$	I.G.1
t_{GS}	Tension dans un ressort de transduction mesurée selon son axe.	$t_{GS} = k_{GS} (x + x_r + d/2 - d P_o - x_a)$	I.D.5.3
T_{GS}	Tension combinée de tous les ressorts de transduction, d'une touffe ciliaire, mesurée selon l'axe de stimulation.	$T_{GS} = N \gamma t_{GS}$	I.D.5.3
K_{ES}	Raideur combinée de tous les ressorts d'extension d'une touffe ciliaire, mesurée selon l'axe de stimulation.	$K_{ES} = N \gamma^2 k_{ES}$	I.D.5.3
X_{ES}	Extension au repos des ressorts d'extension, mesurée selon l'axe de stimulation.	$X_{ES} = x_{ES} / \gamma$	I.D.5.3
λ	Coefficient de friction de la touffe ciliaire.		I.E.3
λ_a	Inverse de la pente de la relation force/vitesse du moteur de l'adaptation, lorsque celle-ci est exprimée selon le grand axe.		I.D.5.3

F_a	Force d'arrêt du moteur de l'adaptation d'une touffe ciliaire, mesurée selon l'axe de stimulation.		I.D.5.3
F_{\max}	Force d'arrêt du moteur de l'adaptation d'une touffe ciliaire, mesurée selon l'axe de stimulation, lorsque les canaux sont maintenus fermés.	$F_{\max} = N_a f_a / \gamma$	I.G.1
C_0	$[Ca^{2+}]$ mesurée au niveau du moteur de l'adaptation, lorsque tous les canaux sont maintenus fermés.		I.G.1
C_M	$[Ca^{2+}]$ mesurée au niveau du moteur de l'adaptation, lorsque tous les canaux sont maintenus ouverts ($C_M \gg C_0$).		I.G.1
C	$[Ca^{2+}]$ mesurée au niveau du moteur de l'adaptation.	$C = C_M P_o + C_0$	I.G.1
S	Paramètre traduisant l'amplitude de la rétroaction du calcium sur la force d'arrêt du moteur de l'adaptation, tel que $F_a = F_{\max} (1 - S P_o)$	$-\frac{C_M}{F_{\max}} \frac{dF_a}{dC} \Big _{ref}$	I.G.1

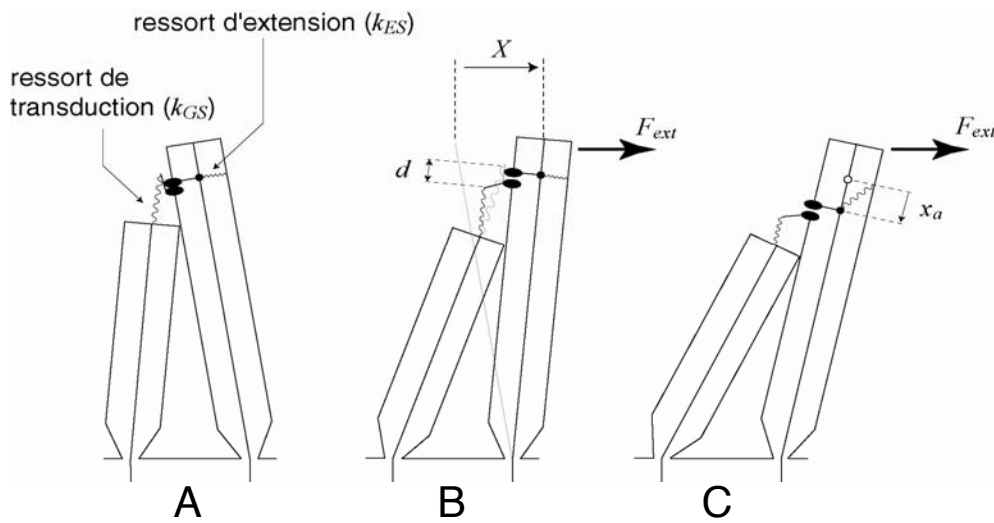


Figure G.1 : Figure reprise du paragraphe I.G.1. Définition de quelques unes des grandeurs du modèle, mises en évidence par une expérience hypothétique. **A.** L'état au repos est supposé être décrit par des canaux tous fermés. **B.** Suite à l'application d'une force F_{ext} positive, tous les canaux s'ouvrent, et cette ouverture diminue l'extension du ressort de transduction de la quantité d . **C.** Lorsque la force extérieure est maintenue, le moteur de l'adaptation glisse vers la racine des stéréocils, ce qui se traduit par un mouvement de ce moteur $x_a > 0$.

Annexe H. Valeurs des paramètres utilisés

Paramètre	Unité	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
K_{GS}	pN/nm	0,750	0,750	1				0,8	0,629	0,3	2	
K_{SP}	pN/nm	0,600	0,600	0,760				0,54	0,47	2,7	3	
K_{ES}	pN/nm	0		0,250				0	1,5	2	0	
D	mm	60,9		45	37,1		45	40	45	180	60	
N		50								45	100	120
λ	pN.s/nm	$2,8.10^{-3}$	$2,8.10^{-4}$	$2,8.10^{-4}$				4.10^{-4}	2.10^{-4}	1.10^{-4}		
λ_u	pN.s/nm	1.10^{-2}	3.10^{-2}	1.10^{-2}	2.10^{-2}	1.10^{-2}			1.10^{-2}	1.10^{-2}	2.10^{-2}	
S		0,85	$0,65-2$	0,3	0,2	3,8		$0,6-8,6$	2,5	3,5	1,5	
f_{max}	pN	400		450	500	330	250	350	420	1800	2500	
γ		0,143								0,06		
kT	pN.mm	4										
$\Delta\mu$	pN.mm	40										
Simulation		oscillations spontanées chez la grenouille		twitch négatif		twitch chez la grenouille				twitch chez la tortue		

Paramètre	Unité	K	L	M	N
K_{GS}	pN/nm	0,39	0,4	8	8
K_{SP}	pN/nm	0,4	0,2	3,1	3,1
K_{ES}	pN/nm	0,8	0,1	0,75	1
D	nm	27	100	33,14	45
N		13	200	150	120
λ	pN.s/nm	$2,8.10^{-4}$	1.10^{-3}	1.10^{-3}	
λ_a	pN.s/nm	1.10^{-2}	2.10^{-2}	5.10^{-4}	
S		2	1	4	6
f_{max}	pN	300	600	800	1000
γ		0,143			
kT	pN.nm	4			
$\Delta\mu$	pN.nm	40			
Simulation		mouvements induits par ΔS		cochlée du rat	

Bibliographie

- 1 - Ashmore J.F. (1987). "A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier." J. Physiol. **388**: 323-47.
- 2 - Assad J.A. & Corey D.P. (1992). "An active motor model for adaptation by vertebrate hair cells." J. Neurosci. **12**(9): 3291-309.
- 3 - Assad J.A., Hacohen N. & Corey D.P. (1989). "Voltage dependence of adaptation and active bundle movement in bullfrog saccular hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**(8): 2918-22.
- 4 - Assad J.A., Shepherd G.M. & Corey D.P. (1991). "Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells." Neuron **7**(6): 985-94.
- 5 - Bashtanov M.E., Goodyear R. & Richardson G. (2004). "The mechanical properties of chick (*Gallus domesticus*) sensory hair bundles: relative contributions of structures sensitive to calcium chelation and subtilisin treatment." J. Physiol. **559**: 287-299.
- 6 - Benser M.E., Marquis R.E. & Hudspeth A.J. (1996). "Rapid, active hair bundle movements in hair cells from the bullfrog's sacculus." J. Neurosci. **16**(18): 5629-43.
- 7 - Berg H.C. (1993). Random walks in Biology Princeton, Princeton University Press.
- 8 - Bozovic D. & Hudspeth A.J. (2003). "Hair-bundle movements elicited by transepithelial electrical stimulation of hair cells in the sacculus of the bullfrog." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**(3): 958-63.
- 9 - Brownell W.E., Bader C.R., Bertrand D. & de Ribaupierre Y. (1985). "Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells." Science **227**(4683): 194-6.
- 10 - Camalet S., Duke T., Julicher F. & Prost J. (2000). "Auditory sensitivity provided by self-tuned critical oscillations of hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(7): 3183-8.
- 11 - Cheung E.L. & Corey D.P. (2005). "Ca²⁺ Changes the Force Sensitivity of the Hair-Cell Transduction Channel." Biophys. J.
- 12 - Corey D.P., Garcia-Anoveros J., Holt J.R., Kwan K.Y., Lin S.Y., Vollrath M.A., Amalfitano A., Cheung E.L., Derfler B.H., Duggan A., Géléoc G.S., Gray P.A., Hoffman M.P., Rehm H.L., Tamasauskas D. & Zhang D.S. (2004). "TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells." Nature **432**(7018): 723-30.
- 13 - Corey D.P. & Hudspeth A.J. (1979). "Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell." Nature **281**(5733): 675-7.
- 14 - Corey D.P. & Hudspeth A.J. (1979). "Response latency of vertebrate hair cells." Biophys. J. **26**(3): 499-506.
- 15 - Corey D.P. & Hudspeth A.J. (1983a). "Analysis of the microphonic potential of the bullfrog's sacculus." J. Neurosci. **3**(5): 942-961.

- 16 - Corey D.P. & Hudspeth A.J. (1983b). "Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells." J. Neurosci. **3**(5): 962-976.
- 17 - Corey D.P. & Sotomayor M. (2004). "Hearing: tightrope act." Nature **428**(6986): 901-3.
- 18 - Crawford A.C., Evans M.G. & Fettiplace R. (1989). "Activation and adaptation of transducer currents in turtle hair cells." J. Physiol. **419**: 405-434.
- 19 - Crawford A.C., Evans M.G. & Fettiplace R. (1989). "Activation and adaptation of transducer currents in turtle hair cells." J Physiol **419**: 405-34.
- 20 - Crawford A.C., Evans M.G. & Fettiplace R. (1991). "The actions of calcium on the mechano-electrical transducer current of turtle hair cells." J. Physiol. **434**: 369-398.
- 21 - Crawford A.C. & Fettiplace R. (1985). "The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells." J. Physiol. **364**: 359-79.
- 22 - Dallos P. (1992). "The active cochlea." J. Neurosci. **12**(12): 4575-4585.
- 23 - Dallos P. & Evans B.N. (1995). "High-frequency motility of outer hair cells and the cochlear amplifier." Science **267**: 2006-2009.
- 24 - Davis H. (1983). "An active process in cochlear mechanics." Hearing Research **9**(1): 79-90.
- 25 - Denk W., Holt J.R., Shepherd G.M. & Corey D.P. (1995). "Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links." Neuron **15**(6): 1311-21.
- 26 - Denk W. & Webb W.W. (1990). "Optical measurement of picometer displacements of transparent microscopic objects." Appl. Opt. **29**: 2382-2391.
- 27 - Denk W., Webb W.W. & Hudspeth A.J. (1989). "Mechanical Properties of Sensory Hair Bundles are Reflected in their Brownian Motion Measured with a Laser Differential Interferometer." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**(14): 5371-5375.
- 28 - Duke T. & Julicher F. (2003). "Active traveling wave in the cochlea." Phys Rev Lett **90**(15): 158101.
- 29 - Eatock R.A., Corey D.P. & Hudspeth A.J. (1987). "Adaptation of mechano-electrical transduction in hair cells of the bullfrog's sacculus." J. Neurosci. **7**(9): 2821-2836.
- 30 - Eguiluz V.M., Ospeck M., Choe Y., Hudspeth A.J. & Magnasco M.O. (2000). "Essential nonlinearities in hearing." Phys. Rev. Lett. **84**(22): 5232-5.
- 31 - Fettiplace R. & Ricci A.J. (2003). "Adaptation in auditory hair cells." Curr. Opin. Neurobiol. **13**(4): 446-51.
- 32 - Fettiplace R., Ricci A.J. & Hackney C.M. (2001). "Clues to the cochlear amplifier from the turtle ear." Trends in Neurosciences **24**(3): 169-175.
- 33 - Flock Å. (1965). "Transducing mechanisms in the lateral line canal organ receptors." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **30**: 133-145.

-
- 34 - Flock Å. & Strelhoff D. (1984). "Graded and nonlinear mechanical properties of sensory hairs in the mammalian hearing organ." Nature **310**(5978): 597-599.
- 35 - Frank G., Hemmert W. & Gummer A.W. (1999). "Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(8): 4420-5.
- 36 - Fridberger A., de Monvel J.B., Zheng J., Hu N., Zou Y., Ren T. & Nuttall A. (2004). "Organ of Corti Potentials and the Motion of the Basilar Membrane." J. Neurosci. **24**(45): 10057-10063.
- 37 - Furness D.N. & Hackney C.M. (1985). "Cross-links between stereocilia in the guinea pig cochlea." Hearing Research **18**(2): 177-188.
- 38 - Garcia J.A., Yee A.G., Gillespie P.G. & Corey D.P. (1998). "Localization of myosin-Ibeta near both ends of tip links in frog saccular hair cells." J. Neurosci. **18**(21): 8637-47.
- 39 - Géléoc G.S., Lennan G.W., Richardson G.P. & Kros C.J. (1997). "A quantitative comparison of mechanoelectrical transduction in vestibular and auditory hair cells of neonatal mice." Proc. Biol. Sci. **264**(1381): 611-21.
- 40 - Gillespie P.G. & Corey D.P. (1997). "Myosin and adaptation by hair cells." Neuron **19**(5): 955-8.
- 41 - Gillespie P.G. & Hudspeth A.J. (1993). "Adenine nucleoside diphosphates block adaptation of mechanoelectrical transduction in hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**(7): 2710-4.
- 42 - Gillespie P.G., Wagner M.C. & Hudspeth A.J. (1993). "Identification of a 120 kd hair-bundle myosin located near stereociliary tips." Neuron **11**(4): 581-94.
- 43 - Gold T. (1948). "Hearing II. The physical basis of the action of the cochlea." Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **135**: 492-498.
- 44 - Gold T. & Pumphrey R.J. (1948). "Hearing I. The cochlea as a frequency analyzer." Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **135**: 462-491.
- 45 - Goodyear R. & Richardson G. (1992). "Distribution of the 275 kD hair cell antigen and cell surface specialisations on auditory and vestibular hair bundles in the chicken inner ear." J. Comp. Neurol. **325**(2): 243-56.
- 46 - Goodyear R. & Richardson G. (1999). "The ankle-link antigen: an epitope sensitive to calcium chelation associated with the hair-cell surface and the calycal processes of photoreceptors." J. Neurosci. **19**(10): 3761-3772.
- 47 - Goodyear R. & Richardson G. (2003). "A novel antigen sensitive to calcium chelation that is associated with the tip links and kinocilial links of sensory hair bundles." J. Neurosci. **23**(12): 4878-87.
- 48 - Hackney C.M., Fettiplace R. & Furness D.N. (1993). "The functional morphology of stereociliary bundles on turtle cochlear hair cells." Hearing Research **69**(1-2): 163-75.
- 49 - Hacohen N., Assad J.A., Smith W.J. & Corey D.P. (1989). "Regulation of tension on hair-cell transduction channels: displacement and calcium dependence." J. Neurosci. **9**(11): 3988-97.
- 50 - Harris G.G., Frishkopf L.S. & Flock Å. (1970). "Receptor potentials from hair cells of the lateral line." Science **167**: 76-79.

- 51 - Holt J.R. & Corey D.P. (2000). "Two mechanisms for transducer adaptation in vertebrate hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(22): 11730-11735.
- 52 - Holt J.R., Corey D.P. & Eatock R.A. (1997). "Mechanoelectrical transduction and adaptation in hair cells of the mouse utricle, a low-frequency vestibular organ (corrected version)." J. Neurosci. **17**(22): 8739-48.
- 53 - Holt J.R., Gillespie S.K., Provance D.W., Shah K., Shokat K.M., Corey D.P., Mercer J.A. & Gillespie P.G. (2002). "A chemical-genetic strategy implicates myosin-1c in adaptation by hair cells." Cell **108**(3): 371-81.
- 54 - Holton T. & Hudspeth A.J. (1986). "The transduction channel of hair cells from the bull-frog characterized by noise analysis." J. Physiol. **375**: 195-227.
- 55 - Howard J. (2001). Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton Sunderland, MA, Sinauer Associates.
- 56 - Howard J. & Ashmore J. (1986). "Stiffness of sensory hair bundles in the sacculus of the frog." Hearing Research **23**: 93-104.
- 57 - Howard J. & Bechstedt S. (2004). "Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors." Curr. Biol. **14**(6): R224-6.
- 58 - Howard J. & Hudspeth A.J. (1987). "Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechanoelectrical transduction by the bullfrog's saccular hair cell." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**(9): 3064-3068.
- 59 - Howard J. & Hudspeth A.J. (1988). "Compliance of the hair bundle associated with gating of mechanoelectrical transduction channels in the Bullfrog's saccular hair cell." Neuron **1**(3): 189-199.
- 60 - Howard J., Roberts W.M. & Hudspeth A.J. (1988). "Mechanoelectrical transduction by hair cells." Ann. Rev. Biophys. Chem. **17**: 99-124.
- 61 - Howard J. & Spudich J.A. (1996). "Is the lever arm of myosin a molecular elastic element?" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(9): 4462-4.
- 62 - Hudspeth A.J. (1982). "Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells." J. Neurosci. **2**(1): 1-10.
- 63 - Hudspeth A.J. (1983). "Mechanoelectrical transduction by hair cells in the acousticolateralis sensory system." Annu. Rev. Neurosci. **6**: 187-215.
- 64 - Hudspeth A.J. (1992). Hair-bundle mechanics and a model for mechanoelectrical transduction by hair cells in Sensory transduction Edité par, The Rockefeller University Press.
- 65 - Hudspeth A.J. (2000). Hearing. in Principles of neural science Edité par Kandel E. R., Schwartz H. S. et Jessel T. M., McGraw-Hill.
- 66 - Hudspeth A.J. & Corey D.P. (1977). "Sensitivity, polarity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**(6): 2407-11.
- 67 - Hudspeth A.J. & Jacobs R. (1979). "Stereocilia mediate transduction in vertebrate hair cells (auditory system/cilium/vestibular system)." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**(3): 1506-9.

-
- 68 - Jacobs R.A. & Hudspeth A.J. (1990). "Ultrastructural correlates of mechanoelectrical transduction in hair cells of the bullfrog's internal ear." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **55**: 547-61.
- 69 - Jaramillo F. & Hudspeth A.J. (1991). "Localization of the hair cell's transduction channels at the hair bundle's top by iontophoretic application of a channel blocker." Neuron **7**(3): 409-20.
- 70 - Jaramillo F. & Hudspeth A.J. (1993). "Displacement-clamp measurement of the forces exerted by gating springs in the hair bundle." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**(4): 1330-4.
- 71 - Jones G.M. & Milsum J.H. (1970). "Characteristics of neural transmission from the semicircular canal to the vestibular nuclei of cats." J. Physiol. **209**: 295-316.
- 72 - Jorgensen F. & Kroese A.B. (1994). "Ionic selectivity of the mechano-electrical transduction channels in the hair cells of the frog sacculus." Acta. Physiol. Scand. **151**(1): 7-16.
- 73 - Jorgensen F. & Ohmori H. (1988). "Amiloride blocks the mechano-electrical transduction channel of hair cells of the chick." J. Physiol. **403**: 577-88.
- 74 - Kachar B., Parakkal M., Kurc M., Zhao Y. & Gillespie P.G. (2000). "High-resolution structure of hair-cell tip links." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(24): 13336-41.
- 75 - Kalinec F., Holley M.C., Iwasa K.H., Lim D.J. & Kachar B. (1992). "A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**(18): 8671-5.
- 76 - Kemp D.T. (1978). "Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system." J. Acoust. Soc. Am. **64**(5): 1386-1391.
- 77 - Kennedy H.J., Crawford A.C. & Fettiplace R. (2005). "Force generation by mammalian hair bundles supports a role in cochlear amplification." Nature **433**(7028): 880-3.
- 78 - Kennedy H.J., Evans M.G., Crawford A.C. & Fettiplace R. (2003). "Fast adaptation of mechanoelectrical transducer channels in mammalian cochlear hair cells." Nat. Neurosci. **6**(8): 832-6.
- 79 - Kroese A.B., Das A. & Hudspeth A.J. (1989). "Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics." Hearing Research **37**(3): 203-17.
- 80 - Kros C.J., Rüsch A. & Richardson G.P. (1992). "Mechano-electrical transducer currents in hair cells of the cultured neonatal mouse cochlea." Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **249**(1325): 185-193.
- 81 - Liberman M.C., Gao J., He D.Z.Z., Wu X., Jia S. & Zuo J. (2002). "Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier." Nature **419**(6904): 300-304.
- 82 - Lombard R.E. (1980). The structure of the amphibian auditory periphery : a unique experiment in terrestrial hearing. in Comparative studies of hearing in vertebrates Edité par Popper A. N. et Fay R. R., Springer Verlag.
- 83 - Lumpkin E.A. & Hudspeth A.J. (1995). "Detection of Ca²⁺ entry through mechanosensitive channels localizes the site of mechanoelectrical transduction in hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**(22): 10297-301.
- 84 - Lumpkin E.A. & Hudspeth A.J. (1998). "Regulation of free Ca²⁺ concentration in hair-cell stereocilia." J. Neurosci. **18**(16): 6300-18.

- 85 - Lumpkin E.A., Marquis R.E. & Hudspeth A.J. (1997). "The selectivity of the hair cell's mechanoelectrical-transduction channel promotes Ca^{2+} flux at low Ca^{2+} concentrations." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**(20): 10997-1002.
- 86 - Manley G.A. (2000). "Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(22): 11736-11743.
- 87 - Manley G.A. & Köppl C. (1998). "Phylogenetic development of the cochlea and its innervation." Curr. Opin. Neurobiol. **8**(4): 468-74.
- 88 - Marquis R.E. & Hudspeth A.J. (1997). "Effects of extracellular Ca^{2+} concentration on hair-bundle stiffness and gating-spring integrity in hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**(22): 11923-8.
- 89 - Martin P., Bozovic D., Choe Y. & Hudspeth A.J. (2003). "Spontaneous oscillation by hair bundles of the bullfrog's sacculus." J. Neurosci. **23**(11): 4533-48.
- 90 - Martin P. & Hudspeth A.J. (1999). "Active hair-bundle movements can amplify a hair cell's response to oscillatory mechanical stimuli." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(25): 14306-11.
- 91 - Martin P. & Hudspeth A.J. (2001). "Compressive nonlinearity in the hair bundle's active response to mechanical stimulation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(25): 14386-91.
- 92 - Martin P., Hudspeth A.J. & Jülicher F. (2001). "Comparison of a hair bundle's spontaneous oscillations with its response to mechanical stimulation reveals the underlying active process." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(25): 14380-5.
- 93 - Martin P., Mehta A.D. & Hudspeth A.J. (2000). "Negative hair-bundle stiffness betrays a mechanism for mechanical amplification by the hair cell." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(22): 12026-31.
- 94 - Nadrowski B. (2004). Rapport de thèse. "Propriétés mécaniques de touffes ciliaires actives." Université Denis Diderot
- 95 - Nadrowski B., Martin P. & Jülicher F. (2004). "Active hair-bundle motility harnesses noise to operate near an optimum of mechanosensitivity." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**(33): 12195-12200.
- 96 - Narins P.M. & Lewis F.R. (1984). "The vertebrate ear as an exquisite seismic sensor." J. Acoust. Soc. Am. **76**: 1384-1387.
- 97 - Ohmori H. (1984). "Mechanoelectrical transducer has discrete conductances in the chick vestibular hair cell." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**(6): 1888-91.
- 98 - Ohmori H. (1985). "Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick." J. Physiol. **359**(1): 189-217.
- 99 - Pae S.S. & Saunders J.C. (1994). "Intra- and extracellular calcium modulates stereocilia stiffness on chick cochlear hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**(3): 1153-1157.
- 100 - Pickles J.O., Comis S.D. & Osborne M.P. (1984). "Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction." Hearing Research **15**(2): 103-12.
- 101 - Pollard T.D., Doberstein S.K. & Zot H.G. (1991). "Myosin-I." Annu. Rev. Physiol. **53**: 653-81.

-
- 102 - Rhode W.S. (1971). "Observations of the vibration of the basilar membrane in squirrel monkeys using the Mossbauer technique." J. Acoust. Soc. Am. **49**: 1218-1231.
- 103 - Rhode W.S. (1980). "Cochlear partition vibration--recent views." J. Acoust. Soc. Am. **67**: 1696-1703.
- 104 - Ricci A.J., Crawford A.C. & Fettiplace R. (2000). "Active hair bundle motion linked to fast transducer adaptation in auditory hair cells." J. Neurosci. **20**(19): 7131-42.
- 105 - Ricci A.J., Crawford A.C. & Fettiplace R. (2002). "Mechanisms of active hair bundle motion in auditory hair cells." J. Neurosci. **22**(1): 44-52.
- 106 - Ricci A.J. & Fettiplace R. (1998). "Calcium permeation of the turtle hair cell mechanotransducer channel and its relation to the composition of endolymph." J. Physiol. **506** (Pt 1): 159-73.
- 107 - Ricci A.J., Kennedy H.J., Crawford A.C. & Fettiplace R. (2005). "The transduction channel filter in auditory hair cells." J. Neurosci. **25**(34): 7831-9.
- 108 - Ricci A.J., Wu Y.C. & Fettiplace R. (1998). "The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in auditory hair cells." J. Neurosci. **18**(20): 8261-77.
- 109 - Robles L. & Ruggero M.A. (2001). "Mechanics of the Mammalian Cochlea." Physiol. Rev. **81**(3): 1305-1352.
- 110 - Ruggero M.A. (1992). "Responses to sound of the basilar membrane of the mammalian cochlea." Curr. Opin. Neurobiol. **2**(4): 449-456.
- 111 - Ruggero M.A., Rich N.C., Recio A., Narayan S.S. & Robles L. (1997). "Basilar-membrane responses to tones at the base of the chinchilla cochlea." J. Acoust. Soc. Am. **101**(4): 2151-63.
- 112 - Ruggero M.A., Robles L. & Rich N.C. (1986). "Basilar membrane mechanics at the base of the chinchilla cochlea. I. Input-output functions, tuning curves, and response phases." J. Acoust. Soc. Am. **80**(5): 1364-1374.
- 113 - Ruggero M.A., Robles L. & Rich N.C. (1986). "Basilar membrane mechanics at the base of the chinchilla cochlea. II. Responses to low-frequency tones and relationship to microphonics and spike initiation in the VIII nerve." J. Acoust. Soc. Am. **80**(5): 1375-1383.
- 114 - Russell I.J., Richardson G.P. & Kossl M. (1989). "The responses of cochlear hair cells to tonic displacements of the sensory hair bundle." Hearing Research **43**(1): 55-69.
- 115 - Santos-Sacchi J. (1992). "On the frequency limit and phase of outer hair cell motility: effects of the membrane filter." J. Neurosci. **12**(5): 1906-1916.
- 116 - Santos-Sacchi J. & Dilger J.P. (1988). "Whole cell currents and mechanical responses of isolated outer hair cells." Hearing Research **35**(2-3): 143-50.
- 117 - Sellick P.M., Patuzzi R. & Johnstone B.M. (1982). "Measurement of basilar membrane motion in the guinea pig using the Mössbauer technique." J. Acoust. Soc. Am. **72**(1): 131-141.
- 118 - Shepherd G.M. & Corey D.P. (1994). "The extent of adaptation in bullfrog saccular hair cells." J. Neurosci. **14**(10): 6217-29.

- 119 - Shotwell S.L., Jacobs R. & Hudspeth A.J. (1981). "Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to controlled deflection of their hair bundles." Ann. NY Acad. Sci. **374**: 1-10.
- 120 - Siemens J., Lillo C., Dumont R.A., Reynolds A., Williams D.S., Gillespie P.G. & Muller U. (2004). "Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia." Nature **428**(6986): 950-5.
- 121 - Sollner C., Rauch G.J., Siemens J., Geisler R., Schuster S.C., Muller U. & Nicolson T. (2004). "Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells." Nature **428**(6986): 955-9.
- 122 - Sotomayor M., Corey D.P. & Schulten K. (2005). "In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats." Structure (Camb.) **13**(4): 669-82.
- 123 - Stauffer E.A., Scarborough J.D., Hirono M., Miller E.D., Shah K., Mercer J.A., Holt J.R. & Gillespie P.G. (2005). "Fast adaptation in vestibular hair cells requires Myosin-1c activity." Neuron **47**(4): 541-53.
- 124 - Strassmaier M. & Gillespie P.G. (2002). "The hair cell's transduction channel." Curr. Opin. Neurobiol. **12**(4): 380-6.
- 125 - Strogatz S.T. (1997). Nonlinear Dynamics and Chaos Reading, MA, Addison-Wesley.
- 126 - Tilney L.G., Derosier D.J. & Mulroy M.J. (1980). "The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells." J. Cell Biol. **86**(1): 244-259.
- 127 - Tilney L.G. & Saunders J.C. (1983). "Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. I. Length, number, width, and distribution of stereocilia of each hair cell are related to the position of the hair cell on the cochlea." J. Cell Biol. **96**(3): 807-21.
- 128 - Tsuprun V., Goodyear R.J. & Richardson G.P. (2004). "The structure of tip links and kinocilial links in avian sensory hair bundles." Biophys. J. **87**(6): 4106-12.
- 129 - Vollrath M.A. & Eatock R.A. (2003). "Time course and extent of mechanotransducer adaptation in mouse utricular hair cells: comparison with frog saccular hair cells." J. Neurophysiol. **90**(4): 2676-89.
- 130 - von Békésy G. (1960). Experiments in Hearing, MacGraw-Hill.
- 131 - Walker R.G., Willingham A.T. & Zuker C.S. (2000). "A Drosophila mechanosensory transduction channel." Science **287**(5461): 2229-34.
- 132 - Wersäll J., Flock Å. & Lundquist P.G. (1965). "Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **30**: 115-147.
- 133 - Wilson J.E. & Chin A. (1991). "Chelation of divalent cations by ATP, studied by titration calorimetry." Anal. Biochem. **193**(1): 16-9.
- 134 - Wilson J.P. (1980). "Evidence for a cochlear origin for acoustic re-emissions, threshold fine-structure and tinnitus." Hearing Research **2**(3-4): 233-252.
- 135 - Wu Y.C., Ricci A.J. & Fettiplace R. (1999). "Two components of transducer adaptation in auditory hair cells." J. Neurophysiol. **82**(5): 2171-81.

136 - Yamoah E.N. & Gillespie P.G. (1996). "Phosphate analogs block adaptation in hair cells by inhibiting adaptation-motor force production." Neuron **17**(3): 523-33.

137 - Yu X.L., Lewis E.R. & Feld D. (1991). "Seismic and auditory tuning curves from bullfrog saccular and amphibian papillar axons." J. Comp. Physiol. [A] **169**(2): 241-248.

138 - Zhao Y., Yamoah E.N. & Gillespie P.G. (1996). "Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(26): 15469-15474.

139 - Zheng J., Shen W., He D.Z., Long K.B., Madison L.D. & Dallos P. (2000). "Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells." Nature **405**(6783): 149-55.

Résumé

Le comportement dynamique d'une touffe ciliaire (l'organelle mécano-sensible des cellules ciliées de l'oreille interne) est très varié. Une touffe ciliaire peut osciller spontanément, avoir une réponse de type « excitable » ou simplement relaxer en réponse à un échelon de force.

En utilisant la iontophorèse pour modifier la concentration en calcium à proximité d'une touffe ciliaire du saccule de la grenouille taureau, et en mesurant les relations force/déplacements de cette organelle, nous sommes parvenus à réconcilier ces manifestations contrastées de sa motilité active. Nous utilisons le calcium et/ou des biais statiques appliqués à la position de la touffe ciliaire pour contrôler la probabilité d'ouverture au repos et par là, son point de fonctionnement. Dans le cas de touffes ciliaires non oscillantes, nous montrons que la polarité et la cinétique des mouvements ciliaires actifs observés en réponse à un échelon de stimulation dépendent du point de fonctionnement de la cellule. Lorsque la relation force/déplacement de la touffe ciliaire possède une région de raideur négative, des oscillations spontanées peuvent être déclenchées lorsque le point de fonctionnement est placé au sein de cette région instable.

Seuls deux ingrédients sont nécessaires pour interpréter ces manifestations de la motilité ciliaire active : l'existence d'une relation force/déplacement non linéaire conséquence de l'activation mécanique directe des canaux de transduction, et l'activité du moteur d'adaptation, fondé sur les myosines et dépendant du calcium. Des simulations numériques reproduisent avec succès un grand nombre d'observations expérimentales, dans des conditions différentes et sur des animaux variés, suggérant qu'un seul mécanisme actif est nécessaire pour décrire toute la gamme des mouvements actifs observés sur les touffes ciliaires des cellules ciliées.

Abstract

The dynamical behaviour of a hair bundle – the mechanosensitive organelle of the hair cells found in the inner ear – is rich. A hair bundle can oscillate spontaneously, “twitch” or simply relax in response to a force step.

Using iontophoresis to affect the Ca^{2+} concentration near a hair bundle from the bullfrog's sacculus and displacement-clamp measurements of the bundle's force-displacement relations, we were able to reconcile these contrasting manifestations of active hair-bundle motility. We used Ca^{2+} and offsets of the bundle's mean position to control the fraction of open transduction channels at steady state and thus the bundle's operating point. In the case of non oscillatory hair bundles, we found that the polarity and kinetics of active hair-bundle movement evoked by a step stimulus depended on the bundle's operating point in the nonlinear force-displacement relation. When the force-displacement relation displayed a region of negative stiffness, spontaneous hair-bundle oscillations arose when the hair bundle was required to operate within this unstable region.

Only two ingredients are necessary to account for the various incarnations of active hair-bundle motility: non-linear gating compliance of the transduction apparatus and the Ca^{2+} -regulated activity of the myosin-based adaptation motor. Numerical simulations successfully reproduced a wide range of observations from different experimental situations and animal species, thereby suggesting that only one force-generating mechanism is needed to describe the seemingly opposite movements that the hair-bundle can produce.